

**Oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung (SEHRS) und
oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) für
analytische Anwendungen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Marina Gühlke

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachterinnen: 1. Prof. Dr. Janina Kneipp

2. Prof. Dr. Inez Weidinger

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2016

Zusammenfassung

Hyper-Raman-Streuung folgt anderen Symmetrierauswahlregeln als Raman-Streuung und profitiert als nicht-linearer Zweiphotonenprozess noch mehr von verstärkten elektromagnetischen Feldern an der Oberfläche plasmonischer Nanostrukturen. Damit könnte die oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung (SEHRS) praktische Bedeutung in der Spektroskopie erlangen. Durch die Kombination von SEHRS und oberflächenverstärkter Raman-Streuung (SERS) können komplementäre Strukturinformationen erhalten werden. Diese eignen sich aufgrund der Lokalisierung der Verstärkung auf die unmittelbare Umgebung der Nanostrukturen besonders für die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Molekülen und Metalloberflächen. Ziel dieser Arbeit war es, ein tieferes Verständnis des SEHRS-Effekts zu erlangen und dessen Anwendbarkeit für analytische Fragestellungen einzuschätzen. Dazu wurden SEHRS-Experimente mit Anregung bei 1064 nm und SERS-Experimente mit Anregung bei derselben Wellenlänge sowie mit Anregung bei 532 nm – für eine Detektion von SEHRS und SERS im gleichen Spektralbereich – durchgeführt. Als Beispiel für nicht-resonante Anregung wurden die vom pH-Wert abhängigen SEHRS- und SERS-Spektren von *para*-Mercaptobenzoessäure untersucht. Mit diesen Spektren wurde die Wechselwirkung verschiedener Silbernanostrukturen mit den Molekülen charakterisiert. Anhand von β -Carotin wurden Einflüsse von Resonanzverstärkung im SEHRS-Experiment durch die gleichzeitige Anregung eines molekularen elektronischen Übergangs untersucht. Dabei wurde durch eine Thiol-funktionalisierung des Carotins eine intensivere Wechselwirkung mit der Silberoberfläche erzielt, sodass nicht nur resonante SEHRS- und SERS-Spektren, sondern auch nicht-resonante SERS-Spektren von Carotin erhalten werden konnten. Die Anwendbarkeit von SEHRS für hyperspektrale Kartierung in Verbindung mit Mikrospektroskopie wurde durch die Untersuchung von Verteilungen verschiedener Farbstoffe auf strukturierten plasmonischen Oberflächen demonstriert.

Abstract

Hyper-Raman scattering follows different symmetry selection rules than Raman scattering and, as a non-linear two-photon process, profits even more than Raman scattering from enhanced electromagnetic fields at the surface of plasmonic nanostructures. Surface-enhanced hyper-Raman scattering (SEHRS) could thus gain practical importance for spectroscopy. The combination of SEHRS and surface-enhanced Raman scattering (SERS) offers complementary structural information. Specifically, due to the localization of the enhancement to the close proximity of the nanostructures, this information can be utilized for the characterization of the interaction between molecules and metal surfaces. The aim of this work was to increase the understanding of the SEHRS effect and to assess its applicability to answer analytical questions. For that purpose, SEHRS experiments with excitation at 1064 nm and SERS experiments with excitation at the same wavelength, as well as with excitation at 532 nm – to detect SEHRS and SERS in the same spectral region – were conducted. As an example for non-resonant excitation, pH-dependent SEHRS and SERS spectra of *para*-mercaptobenzoic acid were examined. Based on these spectra, the interaction of different silver nanostructures with the molecules was characterized. β -Carotene was used to study the influence of resonance enhancement by the excitation of a molecular electronic transition during SEHRS experiments. By the thiol-functionalization of carotene, a more intense interaction with the silver surface was achieved, which enables to obtain not only resonant SEHRS and SERS but also non-resonant SERS spectra of carotene. Hyperspectral SEHRS imaging in combination with microspectroscopy was demonstrated by analyzing the distribution of different dyes on structured plasmonic surfaces.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 11 |
| 2 | Grundlagen | 17 |
| 2.1 | Oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung | 17 |
| 2.1.1 | Hyper-Raman-Streuung | 17 |
| 2.1.2 | Oberflächenverstärkte Raman-Streuung | 20 |
| 2.1.3 | Charakterisierung von Metallnanostrukturen und ihrer Wechselwirkung mit der Umgebung | 23 |
| 2.2 | Analytische Anwendungen der Raman-Streuung | 26 |
| 2.2.1 | Lokale pH-Wert-Bestimmung mit SEHRS und SERS | 26 |
| 2.2.2 | Raman-Spektroskopie von Carotinoiden | 28 |
| 2.2.3 | Möglichkeiten für die multivariate Analyse von SEHRS-Spektren zur Bildgebung | 32 |
| 3 | Material und Methoden | 35 |
| 3.1 | Chemikalien | 35 |
| 3.2 | Herstellung und Immobilisierung der Silbernanopartikel | 36 |
| 3.3 | Herstellung des thiofunktionalisierten Carotins | 39 |
| 3.4 | Raman- und Hyper-Raman-Experimente | 42 |
| 3.5 | Probenpräparation für die SEHRS- und SERS-Experimente | 45 |
| 3.6 | Auswertung der Raman- und Hyper-Raman-Spektren | 46 |
| 3.7 | Weitere Charakterisierung der Nanostrukturen und Analyten | 49 |
| 4 | Analytische Anwendung von SEHRS und SERS am Beispiel eines pH-Sensors | 51 |
| 4.1 | Charakterisierung der Silbernanopartikel | 51 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2 | pH-Abhängigkeit der SEHRS-Spektren von <i>para</i> -Mercaptobenzoessäure . | 54 |
| 4.3 | SERS-Spektren von <i>para</i> -Mercaptobenzoessäure mit Anregung bei 1064 nm | 59 |
| 4.4 | Kombination der verschiedenen Spektren zur Charakterisierung des pH-Sensors | 61 |
| 5 | Oberflächenverstärkte resonante Hyper-Raman-Streuung am Beispiel von Carotinoiden | 67 |
| 5.1 | Allgemeine Charakterisierung der Carotinoide | 68 |
| 5.2 | Oberflächenverstärkungen für thiofunktionalisiertes und nicht funktionalisiertes Carotin | 71 |
| 5.3 | Wechselwirkung der Carotinoide mit der Silberoberfläche | 74 |
| 5.4 | Oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung der Carotinoide | 76 |
| 5.5 | Einflüsse von Resonanz- und Oberflächenverstärkung auf die Raman-Spektren von Carotin | 82 |
| 6 | Bildgebende Experimente an mikrostrukturierten Oberflächen | 87 |
| 6.1 | Anordnung von Nanopartikeln mit Hilfe von Templaten | 89 |
| 6.1.1 | Polystyren-Templates zur Anordnung von Nanopartikeln auf Glasoberflächen | 89 |
| 6.1.2 | Pflanzengewebe als Templat für die Herstellung von Silbernanopartikeln | 93 |
| 6.2 | Strukturierte Verteilung von Analyten auf immobilisierten Silbernanopartikeln | 95 |
| 6.2.1 | Aufbringen von Tropfen in einem Raster | 95 |
| 6.2.2 | Immobilisierung von Nanopartikeln in Gegenwart von Analytlösungen | 96 |
| 6.3 | Multivariate Unterscheidung von SEHRS-Spektren | 108 |
| 6.3.1 | Qualitative Diskussion der Spektren | 108 |
| 6.3.2 | Klassifizierung | 115 |
| 6.4 | Hyperspektrale SEHRS-Bildgebung | 121 |
| 6.4.1 | Beschreibung der Proben und der zu unterscheidenden Probenregionen | 121 |
| 6.4.2 | Multivariate Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Klassifizierung | 127 |
| 6.4.3 | Kartierung | 137 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 7 | Einflüsse auf die Verstärkung im SEHRS- und SERS-Experiment | 141 |
| 7.1 | Elektromagnetische Verstärkung | 141 |
| 7.2 | Salze und Nanopartikelkonzentration | 144 |
| 7.3 | pH-Wert | 148 |
| 7.4 | Anregungswellenlänge | 150 |
| 8 | Fazit | 157 |
| | Literatur | 161 |
| | Danksagung | 183 |
| | Verwendete Symbole und Abkürzungen | 185 |
| | Abbildungsverzeichnis | 189 |
| | Tabellenverzeichnis | 197 |
| | Selbstständigkeitserklärung | 199 |
| | Publikationsliste | 201 |

Kapitel 1

Einleitung

Anhand von Schwingungsspektren lassen sich umfangreiche Informationen über die chemische Zusammensetzung und molekulare Struktur einer Probe erhalten, da die Schwingungsenergien unterschiedlicher funktioneller Gruppen an sich und auch in Abhängigkeit von der molekularen Umgebung spezifisch sind. Die beiden am weitesten verbreiteten schwingungsspektroskopischen Methoden sind die Infrarotabsorptionsspektroskopie und die Raman-Spektroskopie. Bei der Infrarotabsorptionsspektroskopie werden die Proben mit Licht der zur Anregung der Molekülschwingung erforderlichen Energie bestrahlt und die Absorption dieses Lichts wird beobachtet. Bei der Raman-Spektroskopie wird die inelastische Streuung von Licht einer deutlich höheren Energie beobachtet, sodass die Information über die Energie der angeregten Schwingung aus der Differenz der Wellenlängen von Anregungslicht und Streulicht erhalten wird. Aufgrund der unterschiedlichen zugrundeliegenden physikalischen Prozesse dieser beiden und anderer schwingungsspektroskopischer Methoden sind in den Spektren, in Abhängigkeit von der Molekülsymmetrie, jeweils unterschiedliche Schwingungen verschiedener funktioneller Gruppen eines Moleküls beobachtbar.

Die in dieser Arbeit ausgenutzten Prozesse sind die spontane, lineare Raman-Streuung, bei der jeweils ein Photon eine Molekülschwingung anregt und dabei gestreut wird, und die Hyper-Raman-Streuung. Bei der Hyper-Raman-Streuung kombinieren zwei Photonen ihre Energie zur Anregung einer Schwingung und werden so in einem spontanen, nicht-linearen Prozess bei einer größeren Frequenz gestreut (Abb. 1.1 a). Im Unterschied zu anderen nicht-linearen Raman-Prozessen, z. B. der stimulierten Raman-Streuung und der kohärenten anti-Stokes Raman-Streuung, ist Hyper-Raman-Streuung nicht kohärent und damit wesentlich schwächer. Hyper-Raman-Spektren fol-

gen oftmals ähnlichen Symmetrierauswahlregeln wie Infrarotabsorptionsspektren,^[1,2] können zusätzlich sogenannte „stumme Moden“ enthalten, die weder in konventionellen Raman-Spektren noch in Infrarotspektren beobachtbar sind,^[1,3-5] und liefern damit komplementäre Informationen zu einphotonenangeregten Raman-Spektren. Im Gegensatz zur Infrarotabsorptionsspektroskopie stellen jedoch wässrige Proben kein Problem dar und es können aufgrund der kürzeren Anregungswellenlängen wesentlich kleinere Fokusvolumina und damit bessere Ortsauflösungen realisiert werden. Gegenüber der linearen Raman-Streuung hat die Hyper-Raman-Streuung, neben den geänderten Auswahlregeln, alle Vorteile, die auch bei anderen Zweiphotonenprozessen zum Tragen kommen. Insbesondere ist aufgrund der quadratischen Abhängigkeit der Signalintensität von der Anregungsintensität das Probenvolumen, aus dem das Signal erhalten wird, stark begrenzt.^[6] Zudem sorgt der große spektrale Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge dafür, dass das Anregungslicht die Spektren nicht überlagert^[7] und dass die Vorteile von Anregung im nahen Infrarot – hohe Eindringtiefe und geringe Photonenenergie – mit der apparativ einfacheren Detektion im sichtbaren Spektralbereich kombiniert werden können.

Ein Nachteil der Raman-Spektroskopie sind die im Vergleich zu anderen spektroskopischen Methoden, z. B. Fluoreszenzspektroskopie, relativ geringen Signalintensitäten. Bei der Hyper-Raman-Streuung ist dies aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit des Zweiphotonenprozesses noch problematischer, sodass die Beobachtung der Hyper-Raman-Streuung von Analytmolekülen in Lösungen nicht ohne weiteres möglich ist. Dies kann umgangen werden, indem die zu untersuchenden Moleküle an der Oberfläche von Metallnanostrukturen adsorbiert werden, wo eine Verstärkung des Raman-Signals basierend auf zwei Effekten stattfindet. Zum einen können an der Metalloberfläche lokalisierte Oberflächenplasmonen – kollektive Schwingungen der Elektronen an der Metalloberfläche – angeregt werden, die das elektromagnetische Feld der Anregungs- und Streustrahlung um mehrere Größenordnungen verstärken können. Zum anderen können chemische Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und der Metalloberfläche zu einer Änderung der Polarisierbarkeit der adsorbierten Moleküle und damit ebenfalls zu einer Verstärkung der Raman-Streuung führen. Da beide Effekte nur in der unmittelbaren Umgebung der Metallnanostrukturen wirken, sind die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) und die oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung (SEHRS) extrem lokale Phänomene. Zudem sind SERS^[8,9] und insbesondere SEHRS^[10-12] stark abhängig von der Adsorptionsgeo-

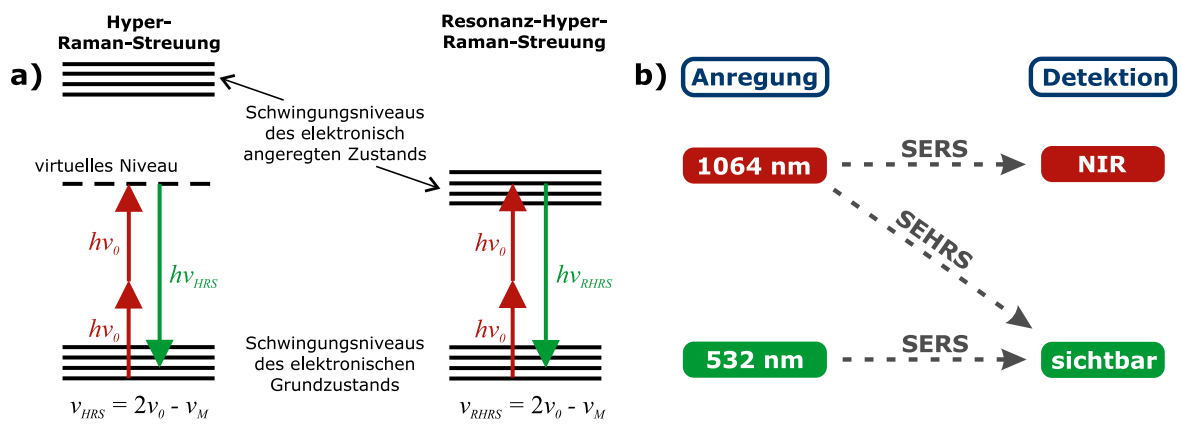


Abb. 1.1: (a) Schematische Darstellung von nicht-resonanter und resonanter Hyper-Raman-Streuung anhand der Energieniveaus im untersuchten Molekül. ν_0 : Frequenz der Anregungsstrahlung; ν_M : Frequenz der Molekülschwingung; ν_{HRS} , ν_{RHRS} : Frequenzen der Hyper-Raman-Streuung bzw. Resonanz-Hyper-Raman-Streuung; h : Plancksches Wirkungsquantum. (b) Konzept der in dieser Arbeit miteinander verglichenen SE(R)HRS- und SE(R)RS-Experimente.

metrie und der lokalen chemischen Umgebung, sodass sie zusätzlich zur Strukturinformation der untersuchten Moleküle wertvolle Informationen über Molekül-Metall-Wechselwirkungen liefern können.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Vertiefung des Verständnisses von SEHRS, um deren Etablierung als zu SERS komplementäre analytische Methode voranzutreiben. Dazu wurden SEHRS-Experimente und SERS-Experimente mit identischen Proben in kurzer zeitlicher Abfolge in einem gemeinsamen mikrospektroskopischen Aufbau durchgeführt. Dabei erfolgte zum einen die Anregung bei derselben Wellenlänge im nahen Infrarot (1064 nm), wodurch die SEHRS-Spektren im sichtbaren Spektralbereich und die SERS-Spektren im nahen Infrarot auftreten (Abb. 1.1 b). Zum anderen wurden die bei 1064 nm angeregten SEHRS-Spektren mit SERS-Spektren, die bei 532 nm angeregt wurden und somit in demselben Spektralbereich wie die SEHRS-Spektren detektiert wurden, verglichen (Abb. 1.1 b).

Als Substrate für die Oberflächenverstärkung wurden kolloidale Silbernanopartikelösungen bzw. aus diesen Lösungen auf Glasoberflächen immobilisierte Silbernanopartikel verwendet, die aufgrund ihrer plasmonischen Eigenschaften für Experimente bei den hier verwendeten Anregungswellenlängen gut geeignet sind. Für eine effiziente Verstärkung von Hyper-Raman- oder Raman-Streuung sind Plasmonenresonanzen sowohl bei der Wellenlänge der Anregungsstrahlung als auch bei der der Streustrahlung erforderlich, die bei der Hyper-Raman-Streuung relativ weit voneinander entfernt sind. Die Untersuchung von SERS bei sowohl Anregungs- als auch Streuwel-

lenlänge von SEHRS, parallel zu den SEHRS-Untersuchungen selbst, ermöglicht somit eine Charakterisierung der verschiedenen Prozesse bei der Oberflächenverstärkung der Hyper-Raman-Streuung. Die verwendeten Silbernanostrukturen zeigen bei optischer Anregung Plasmonenresonanzen zwischen 400 und 450 nm, sodass eine Feldverstärkung an der Nanopartikeloberfläche vor allem im sichtbaren Spektralbereich zu erwarten ist. Simulationen und Experimente mit Anregung durch Elektronenstrahlen haben jedoch gezeigt, dass durch elektromagnetische Wechselwirkung von Silber- oder Goldnanostrukturen untereinander oder mit den adsorbierten Molekülen im Nahfeld multipolare Plasmonenresonanzen im Spektralbereich des nahen Infrarots angeregt werden können,^[13–16] sodass auch dort eine hohe SERS-Verstärkung möglich ist.^[14,15,17–21] Für solche Wechselwirkungen sind allerdings passende Morphologien und Oberflächenbeschaffenheiten der Nanostrukturen erforderlich, sodass die Auswahl der Nanostrukturen für im nahen Infrarot angeregte SEHRS- und SERS-Experimente wesentlich eingeschränkter ist als für SERS bei Anregung im sichtbaren Spektralbereich.

Zunächst wurden verschiedene Arten von Silbernanopartikeln, die sich in Morphologie und Oberflächenstabilisierung unterscheiden, hinsichtlich ihrer Möglichkeiten im SEHRS- und SERS-Experiment verglichen. Dazu wurde *para*-Mercaptobenzoessäure (*p*MBA), eine Verbindung mit vom pH-Wert abhängigen SERS-Spektren,^[22–27] verwendet. Über die Charakterisierung der Silbernanostrukturen durch den systematischen Vergleich der verschiedenen Anregungsbedingungen hinaus konnte durch die Kombination der verschiedenen Daten eine ergänzende Charakterisierung von *p*MBA auf Silberoberflächen für lokale pH-Messungen erfolgen. Insbesondere wurde die pH-Wert-Abhängigkeit der SEHRS-Spektren von *p*MBA ausführlich diskutiert. Zudem eröffnen die bei 1064 nm angeregten SERS-Spektren von *p*MBA, die hier erstmals untersucht wurden, neue Anwendungsmöglichkeiten für biologische Fragestellungen.

Elektronische Übergänge in den untersuchten Molekülen haben ebenfalls einen Einfluss auf Raman- bzw. Hyper-Raman-Spektren, wenn sie sich in Resonanz mit der Anregungsfrequenz bzw. deren zweiter Harmonischer (Abb. 1.1 a) befinden.^[28,29] Durch Wechselwirkungen der Moleküle mit den Metallnanostrukturen können die elektronischen Übergänge im SERS-Experiment noch weitere Einflüsse haben,^[30–32] und die Anteile von Oberflächenverstärkung und Resonanzverstärkung sind in den resultierenden Spektren oft nicht vollständig unterscheidbar. Eine Molekülklasse, deren Resonanz-Raman-Streuung bereits vielfach untersucht wurde, sind die Carotinoide, da sie einerseits in vielen komplexen natürlichen Systemen vorkommen^[33] und andererseits

aufgrund ihrer ausgedehnten π -Elektronensysteme intensive elektronische Übergänge aufweisen, die resonante Raman-Untersuchungen ermöglichen.^[34–37] Carotinoide sind allerdings für SERS-Untersuchungen oft schwer zugänglich, da sie nur selten funktionelle Gruppen mit Affinität zu Metalloberflächen aufweisen. Neben β -Carotin wurde in dieser Arbeit das thiolethylfunktionalisierte 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin untersucht. Das funktionalisierte Carotin kann stärkere Wechselwirkungen mit der Oberfläche von Silbernanopartikeln eingehen und vereinfacht somit nicht nur resonante SEHRS- und SERS-Untersuchungen, sondern es ermöglicht auch, nicht-resonante SERS-Spektren eines Carotins in wässrigen Lösungen bei niedrigen Konzentrationen zu erhalten. Auf diese Weise wird der in Raman-Spektren von festem Carotin auch bei nicht-resonanter Anregung vorhandene Einfluss des elektronischen Übergangs^[38] minimiert. Der dadurch ermöglichte Vergleich der nicht-resonanten SERS-Spektren und der resonanten SEHRS- und SERS-Spektren gibt Hinweise auf die verschiedenen Einflüsse von Oberflächen- und Resonanzverstärkung auf die Spektren.

Reale analytische Fragestellungen beinhalten meist die Untersuchung komplexer Gemische und oft auch der lokalen Verteilung verschiedener Komponenten in einer Probe. Hierzu haben sich SERS-Spektren in Kombination mit multivariater Statistik bereits als geeignet erwiesen.^[39–41] Dabei wird die spezifische Strukturinformation in den Spektren ausgenutzt, indem nicht nur einzelne Banden, sondern gesamte Spektren mit mathematischen Algorithmen hinsichtlich ihrer Ähnlichkeiten oder Unterschiede untersucht werden. Mit derartigen Analysen können hyperspektrale Karten einer Probe erstellt werden, die auf der Klassifizierung oder Gruppierung der Spektren anhand einer Vielzahl spektraler Merkmale basieren. SEHRS kann komplementäre Strukturinformationen zu SERS liefern und ist noch stärker lokalisiert. Somit ermöglicht SEHRS theoretisch Kartierungen in hoher Ortsauflösung, ist jedoch für reale Bildgebungsprobleme bisher nicht etabliert. Grundlegende Untersuchungen bildgebender SEHRS-Experimente anhand einfacher mikrostrukturierter plasmonischer Oberflächen werden nun in dieser Arbeit diskutiert. Die Strukturierung der Oberflächen erfolgte einerseits durch definierte flächige Anordnung von Silbernanopartikeln mit Hilfe verschiedener Template und andererseits durch die Verteilung verschiedener Analyten auf homogenen Silbernanopartikelschichten. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die SEHRS-Bildgebung, insbesondere in Kombination mit und ergänzend zur SERS-Bildgebung, ein großes Potential für die Untersuchung von Analytverteilungen, aber auch für die orts aufgelöste Untersuchung von Metall-Molekül-Wechselwirkungen hat.

Anhand der hier beschriebenen Experimente soll in dieser Arbeit die Nutzbarkeit von SEHRS für analytische Anwendungen demonstriert werden. Voraussetzungen für die Anwendung sind vor allem die Möglichkeit, Spektren auch bei nicht-resonanter Anregung zu erhalten, und die Fähigkeit, Kartierungen basierend auf SEHRS-Daten durchzuführen. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt in den Kapiteln 4-7: In Kapitel 4 werden die vom pH-Wert abhängigen SEHRS- und SERS-Spektren von *p*MBA vorgestellt, Kapitel 5 dient der Diskussion der Spektren von Carotinoiden und Kapitel 6 beschreibt Experimente zur Bildgebung. Im Hinblick auf die Anwendung von SEHRS für analytische Fragestellungen wird in Kapitel 7 ausführlich diskutiert, welche Faktoren die Verstärkung in einem SEHRS-Experiment beeinflussen können.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Weiterentwicklung der oberflächenverstärkten Hyper-Raman-Streuung (engl. *surface-enhanced hyper-Raman scattering*, SEHRS) zur Verwendung in der Analytik. Im Folgenden sind daher zunächst der Hyper-Raman-Effekt, das Prinzip der Oberflächenverstärkung, mögliche Wechselwirkungen zwischen Analytmolekülen und den verstärkenden Oberflächen und Methoden zur Charakterisierung der Eigenschaften der verstärkenden Metallnanostrukturen beschrieben.

2.1.1 Hyper-Raman-Streuung

Raman-Streuung ist ein inelastischer Streuprozess, bei dem die Energiedifferenz zwischen Anregungs- und Streulicht der charakteristischen Energie einer in der bestrahlten Materie angeregten molekularen Schwingung entspricht. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, spezifische Strukturinformation über eine Probe zu erhalten. Die Anregung von Raman-Streuung findet üblicherweise mit Wellenlängen im Bereich des sichtbaren oder nahinfraroten Lichts statt, also bei deutlich größerer Energie als für die Schwingung einer chemischen Bindung erforderlich ist. Da die Energie dieses Anregungslichts in den meisten Fällen nicht ausreicht, um elektronische Übergänge im betrachteten Molekül anzuregen, wird das Molekül nur bis zu einem virtuellen Energieniveau unterhalb des ersten angeregten elektronischen Zustandes angeregt und kehrt dann in ein vom ursprünglichen abweichendes Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustands zurück (Abb. 2.1 a, linkes Schema). Prinzipiell sind hierbei zwei Vor-

gänge möglich: eine Wechselwirkung des Lichts mit dem Schwingungsgrundzustand des Moleküls, die das Molekül in ein höheres Schwingungsniveau überführt und zu einer geringeren Energie des Streulichts führt, die sogenannte Stokes-Streuung (Abb. 2.1 a), oder eine Wechselwirkung des Lichts mit einem angeregten Schwingungszustand, die zu einer Abregung des Moleküls und höherenergetischer Streustrahlung führt. Der letztere Prozess, auch Anti-Stokes-Raman-Streuung genannt, wurde in den Experimenten für diese Arbeit nicht untersucht, daher wird er hier nicht weiter thematisiert.

Die Intensität I_{RS} der normalen, linearen, spontanen Raman-Streuung ist proportional zur Anregungsintensität I_0 , der Anzahl der zum Signal beitragenden Moleküle N und einem für die jeweilige Schwingung spezifischen Streuquerschnitt σ (Gl. 2.1).

$$I_{RS} \propto N \cdot \sigma \cdot I_0 \quad (2.1)$$

Der Streuquerschnitt ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Photon in einem Raman-Prozess eine bestimmte Schwingung anregt und gestreut wird und liegt üblicherweise in der Größenordnung von 10^{-30} - 10^{-27} cm² pro Molekül.^[42]

Neben der linearen Raman-Streuung, bei der jeweils ein anregendes Photon gestreut wird, treten auch nicht-lineare Streuprozesse auf. Von diesen wird in dieser Arbeit die spontane Hyper-Raman-Streuung untersucht, bei der die Energie von zwei gleichen Photonen, die simultan auf ein Molekül treffen, für die Anregung einer Molekülschwingung kombiniert wird. Nach der Anregung der molekularen Schwingung wird dann nur ein Photon gestreut, dessen Energie der doppelten Energie der anregenden Photonen, verschoben um den Betrag der Schwingungsenergie, entspricht (Abb. 2.1 a, rechtes Schema).

Damit eine Schwingung in einem Raman-Prozess angeregt werden kann, muss sie eine Änderung der Polarisierbarkeit α des Moleküls hervorrufen. Hyper-Raman-Streuung basiert dagegen auf einer Änderung der Hyperpolarisierbarkeit β , die dem Koeffizienten des quadratischen Terms in einer Reihenentwicklung des durch das anregende elektrische Feld E induzierten Dipolmoments μ entspricht (Gl. 2.2).^[1]

$$\mu(E) = \alpha E + \frac{1}{2}\beta E^2 + \dots \quad (2.2)$$

Somit hängen die beobachtbaren Schwingungen nicht allein von den beteiligten Atomen und Bindungen, sondern auch von der Symmetrie des jeweiligen Moleküls ab. Daraus ergibt sich der größte Vorteil der Zweiphotonenanregung, nämlich die von

2.1 Oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung

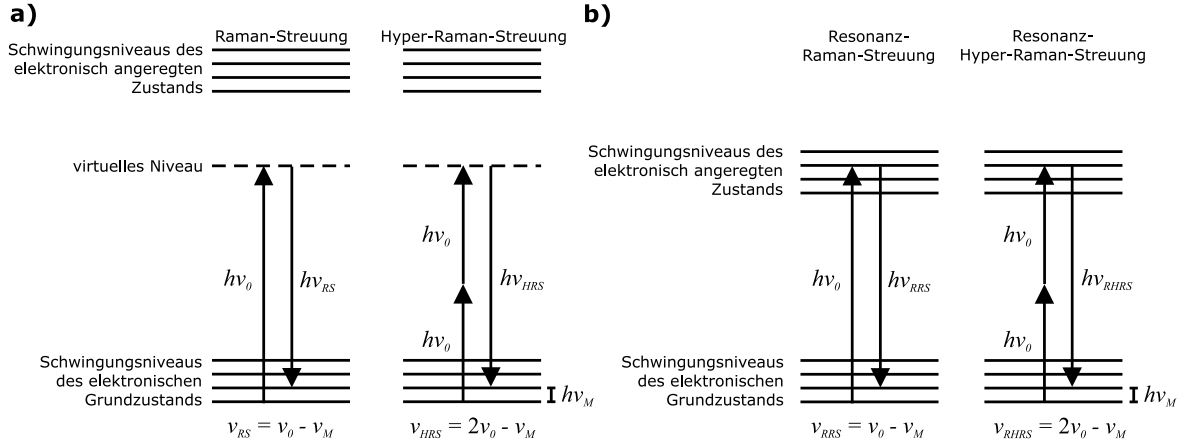


Abb. 2.1: Schematische Darstellung von (a) nicht-resonanter und (b) resonanter Stokes-Raman- und Stokes-Hyper-Raman-Streuung anhand der Energieniveaus im untersuchten Molekül. ν_0 : Frequenz der Anregungsstrahlung; ν_M : Frequenz der Molekülschwingung; ν_{RS} , ν_{HRS} , ν_{RRS} , ν_{RHRS} : Frequenzen der Raman-Streuung, Hyper-Raman-Streuung, Resonanz-Raman-Streuung bzw. Resonanz-Hyper-Raman-Streuung; h : Plancksches Wirkungsquantum.

der linearen Raman-Streuung abweichenden Symmetrierauswahlregeln, durch die aus einem Hyper-Raman-Spektrum zusätzliche Informationen über die molekulare Struktur einer Probe erhalten werden können. Für Moleküle mit einem Inversionszentrum schließen sich die Auswahlregeln für Ein- und Zweiphotonenanregung theoretisch gegenseitig aus, wobei in den Hyper-Raman-Spektren prinzipiell die gleichen Moden auftreten, die auch in Infrarotabsorptionsspektren beobachtet werden.^[1,2] Dahingegen weisen die ein- und zweiphotonenangeregten Raman-Spektren von nicht zentrosymmetrischen Molekülen im wesentlichen die gleichen Banden auf.^[2] Zusätzlich können in Hyper-Raman-Spektren sogenannte „stumme Moden“ beobachtet werden, die sowohl in linearen Raman-Spektren als auch in Infrarotspektren symmetrieverboten sind.^[1,3–5]

Weitere Motivationen für die Anwendung der Hyper-Raman-Spektroskopie ergeben sich durch experimentelle Betrachtungen. Die Intensität der Hyper-Raman-Streuung ist proportional zum Quadrat der Anregungsintensität, die von der Mitte bzw. vom Fokuspunkt des anregenden Laserstrahls nach außen hin stark abfällt. Gleichzeitig werden die hohen Photonenflussdichten, die für die Anregung eines Zweiphotonenprozesses erforderlich sind, nur direkt im Zentrum des anregenden Laserstrahls erreicht.^[2,6] Daraus ergibt sich eine extreme lokale Begrenzung des Probevolumens, aus dem das Signal zu erwarten ist, was für Mikroskopie-Anwendungen eine hohe Ortsauflösung ermöglicht.^[6] Einen weiteren Vorteil stellt der, im Vergleich zu linearen optischen Spektroskopiemethoden, große Abstand zwischen Anregungs- und Streufrequenz dar. Dieser ermöglicht

eine Anregung im Bereich des nahen Infrarots, wo insbesondere biologische Proben transparent sind und wenig Photodegradation zu erwarten ist, bei gleichzeitiger Detektion im Bereich des sichtbaren Lichts, die experimentell einfacher umzusetzen ist.

Da Raman- und Hyper-Raman-Spektren die Wellenlängendifferenz zwischen Anregungs- und Streustrahlung zeigen, sind sie grundsätzlich unabhängig von der Anregungswellenlänge. Für Moleküle, die Chromophore mit elektronischen Übergängen im Bereich des sichtbaren Lichts enthalten, kann es jedoch zu einem zusätzlichen Resonanzeffekt kommen, wenn die Anregungswellenlänge bzw. bei der Zweiphotonenanregung deren zweite Harmonische^[29] der Energie des elektronischen Übergangs entspricht. In diesem Fall werden sowohl der elektronische Übergang als auch der Schwingungsübergang angeregt, was zu einer Kopplung beider führt. Dabei können unterschiedliche Schwingungsniveaus des elektronisch angeregten Zustands beteiligt werden;^[43] ein möglicher, aus der Kopplung resultierender Übergang ist in Abb. 2.1 b dargestellt. Die Kopplung des Schwingungsübergangs mit dem elektronischen Übergang führt zu einer Verstärkung der Raman-Streuung um einen Faktor von 10^3 - 10^4 ^[28] bzw. zu einer Verstärkung der Hyper-Raman-Streuung um 10^4 - 10^6 ^[44]. Diese Verstärkung betrifft selektiv diejenigen Moden, die innerhalb oder in der Nähe der chromophoren Gruppe bzw. in Teilen des Moleküls, deren Polarisierbarkeit sich während des elektronischen Übergangs stark ändert, auftreten.^[43] Dadurch können Informationen über die Eigenschaften der beteiligten elektronischen Zustände erhalten werden.^[45]

2.1.2 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung

Die Intensität von Raman-Streuung ist im Vergleich zur elastischen Rayleigh-Streuung gering. Im Fall der Hyper-Raman-Streuung kommt zusätzlich die geringe Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Zweiphotonenprozesses zum Tragen, sodass typische Streuquerschnitte in der Größenordnung von $10^{-65} \text{ cm}^4 \text{ s}^{-1}$ pro Molekül^[46] liegen. Daher sind für die Messung der Spektren oft lange Integrationszeiten oder hohe Anregungsintensitäten erforderlich, die potentielle Anwendungsmöglichkeiten stark einschränken. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit finden Methoden zur Verstärkung der Raman- bzw. Hyper-Raman-Streuung verbreitete Anwendung. Neben der in Abschnitt 2.1.1 bereits erwähnten Resonanz-Verstärkung existiert als weitere, wesentlich effektivere Möglichkeit die Oberflächenverstärkung in Gegenwart von Metallnanostrukturen. Für die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) werden üblicherweise Verstärkungen von 10^6 - 10^8 beobachtet,^[47] in Einzelmo-

lekül-Untersuchungen wurden aber auch Verstärkungsfaktoren von bis zu 10^{14} erreicht.^[48,49] Für SEHRS wurden Verstärkungsfaktoren von bis zu 10^{20} berichtet.^[50]

Für die Oberflächenverstärkung spielen sowohl elektromagnetische als auch chemische Effekte eine Rolle, wobei es Hinweise darauf gibt, dass die elektromagnetische Verstärkung einen wesentlich größeren Anteil hat als die chemische Verstärkung.^[46,51] Die genauen Anteile der beiden Verstärkungsmechanismen sind jedoch noch Gegenstand der aktuellen Forschung^[52] und sind abhängig von der Art der untersuchten Moleküle und von den verwendeten plasmonischen Substraten.

Die elektromagnetische Verstärkung basiert auf der Anregung von Oberflächenplasmonen in den Metallnanostrukturen. Die Oberflächenplasmonen sind kollektive Schwingungen der Valenzelektronen an der Oberfläche des Metalls. Durch die geringe Größe der Nanostrukturen sind die Plasmonen in diesen stark lokalisiert und haben eine für das jeweilige Metall und die Größe der Nanostruktur charakteristische Resonanzfrequenz.^[53] Dadurch ergeben sich in Nanostrukturen andere optische Eigenschaften als in makroskopischem Metall und das elektrische Feld in der unmittelbaren Nähe der Metalloberfläche wird bei Anregung in Resonanz mit den Plasmonen im Vergleich zum anregenden Feld verstärkt. Für SERS werden als Metalle in den verstärkenden Nanostrukturen im wesentlichen Silber und Gold verwendet, deren dielektrische Eigenschaften intensive Plasmonenresonanzen im sichtbaren Spektralbereich ermöglichen. Durch Kopplung der Plasmonen mehrerer Nanostrukturen, z.B. durch Aggregation kolloidaler Nanopartikel,^[54] oder durch Wechselwirkung mit den adsorbierten Molekülen^[13] lassen sich auch multipolare Plasmonenresonanzen erzeugen, die bei anderen Frequenzen als die bei optischer Anregung beobachtbaren dipolaren Plasmonenresonanzen liegen, z.B. im nahen Infrarot.^[14–16] Bei ultravioletten Anregungswellenlängen hingegen sind Silber und Gold nicht geeignet, sodass auf andere Metalle, z.B. Aluminium,^[55,56] zurückgegriffen wird.

Für die Raman-Streuung eines Moleküls, das sich an der Metalloberfläche befindet, bewirken die Plasmonen, dass das Feld des Anregungslichts verstärkt wird. Im Anschluss daran kann die Raman-Streuung, da deren Frequenz nah an der Anregungsfrequenz liegt, ebenfalls von dem verstärkten Feld profitieren. Somit ist die SERS-Intensität I_{SERS} , das Betragsquadrat der SERS-Feldstärke E_{SERS} , nicht nur von der Intensität des Anregungslichts I_0 abhängig, sondern auch von Verstärkungsfaktoren $g(\nu_0)$ und $g(\nu_S)$ der Amplituden von Anregungs- bzw. Streulicht (Gl. 2.3).^[46,57]

Die Intensität von Hyper-Raman-Streuung ist proportional zum Quadrat der Anre-

$$I_{SERS} = |E_{SERS}|^2 \propto I_0 \cdot |g(\nu_0)|^2 \cdot |g(\nu_S)|^2 \quad (2.3)$$

gungsintensität, daher ist der Einfluss der Intensität des verstärkten Anregungsfeldes auf die SEHRS-Intensität I_{SEHRS} ebenfalls quadratisch (Gl. 2.4), sodass SEHRS noch wesentlich mehr von der plasmonischen Verstärkung profitieren kann als SERS.

$$I_{SEHRS} \propto I_0^2 \cdot |g(\nu_0)|^4 \cdot |g(\nu_S)|^2 \quad (2.4)$$

Dabei ist allerdings zu beachten, dass bei SEHRS die Frequenzen von Anregungs- und Streulicht wesentlich weiter voneinander entfernt sind als bei SERS, sodass die Auswahl geeigneter Nanostrukturen mit Plasmonenresonanzen bei den passenden Frequenzen schwieriger ist und unter Umständen nur einer der beiden Verstärkungsfaktoren zum Tragen kommt. In allen Fällen nimmt das verstärkte Feld mit der dritten Potenz des Abstandes von der Metalloberfläche ab.^[58] Das bedeutet unter Berücksichtigung von Gl. 2.3 und Gl. 2.4 eine Abnahme der SERS-Verstärkung mit der 12. Potenz und der SEHRS-Verstärkung mit der 18. Potenz des Abstands des betrachteten Moleküls von der Metalloberfläche. Somit handelt es sich bei SEHRS und SERS um extreme Nahfeldeffekte, mit denen nur die unmittelbare Umgebung der Metallnanostrukturen untersucht wird.

Während die elektromagnetische Verstärkung zwar nur in einem kleinen Bereich oberhalb der Metalloberfläche wirkt, aber trotzdem keinen direkten Kontakt der Moleküle mit der Metalloberfläche erfordert, wirken chemische Verstärkungseffekte noch lokaler, da für diese eine chemische Wechselwirkung der Moleküle mit dem Metall notwendig ist. Dabei können z. B. *Charge-Transfer*-Komplexe zwischen den Molekülen und dem Metall gebildet werden,^[59] die die Polarisierbarkeit der Moleküle und damit deren Raman-Streuquerschnitt verändern. Während Oberflächen mit nanoskaligen Rauigkeiten bei der chemischen Verstärkung für die Bildung aktiver Adsorptionsstellen erforderlich sind,^[60] führen sie auch bei der elektromagnetischen Verstärkung zu einer hohen Lokalisierung der Plasmonen und damit zu einer großen Verstärkung der elektromagnetischen Felder an der Oberfläche.^[53]

Als SERS-Substrate kommen, neben elektrochemisch aufgerauten Silberelektroden, an denen der SERS-Effekt anfänglich beobachtet wurde,^[61–63] vor allem Metallnanopartikel in kolloidaler Lösung,^[64–67] auf Trägern immobilisierte Nanopartikel,^[68–70] und Metallinseln,^[71,72] aber auch mit Hilfe lithographischer Methoden strukturier-

te Metalloberflächen^[73,74] zum Einsatz. Für SEHRS können prinzipiell vergleichbare Substrate verwendet werden.^[10,11,75,76] Jedoch müssen die plasmonischen Eigenschaften und die Oberflächenbeschaffenheit genauer kontrolliert werden, da SEHRS wesentlich empfindlicher gegenüber der Anordnung der Nanostrukturen,^[77] der Adsorptionsgeometrie^[10] und damit auch der Umgebungseinflüsse, wie z. B. elektrochemische Potentiale oder vorhandene Ionen,^[11] ist. Diese Empfindlichkeit von SEHRS lässt gleichzeitig Rückschlüsse auf die Molekül-Metall-Wechselwirkungen zu, die insbesondere in Kombination mit den diesbezüglichen Informationen aus SERS-Spektren umfangreiche Charakterisierungen dieser Wechselwirkungen ermöglichen, wie in dieser Arbeit anhand verschiedener Systeme gezeigt werden soll.

2.1.3 Charakterisierung von Metallnanostrukturen und ihrer Wechselwirkung mit der Umgebung

Mit SEHRS und SERS lassen sich nur die in der direkten Nähe der plasmonischen Metalloberflächen befindlichen Moleküle oder funktionellen Gruppen untersuchen. Eine verlässliche Wechselwirkung zwischen Metall und Molekülen ist also erforderlich, hängt aber von der Beschaffenheit der Metalloberfläche und den Eigenschaften der jeweiligen Analyten ab. So werden z. B. die Konformation der in SERS- oder SEHRS-Experimenten untersuchten Moleküle und ihre Adsorptionsgeometrie in Bezug zur Metalloberfläche insbesondere durch den Bedeckungsgrad der Oberfläche,^[78–80] aber auch durch Umgebungseinflüsse, wie den pH-Wert^[25,81] oder die Anwesenheit anorganischer Ionen^[67,82,83] beeinflusst. Gleichzeitig werden bei SEHRS- und SERS-Experimenten, in denen kolloidale Metallnanopartikel verwendet werden, oftmals gezielt oder zufällig Aggregationen der Nanopartikel erzeugt, um die Abstände zwischen den Nanostrukturen zu verringern, sodass eine Kopplung ihrer Plasmonen erfolgen kann, die zu einer höheren Verstärkung führt. Aus diesen Gründen ist es wichtig, die verwendeten Nanostrukturen unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen auch mit anderen Methoden zu charakterisieren.

Einen wesentlichen Beitrag hierzu leistet die Extinktionsspektroskopie, bei der die optischen Eigenschaften der Nanostrukturen untersucht werden. Hierzu werden die Proben mit Licht durchstrahlt, das üblicherweise im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich liegt, aber sich auch bis ins nahe Infrarot erstrecken kann. Aus der Differenz der Intensitäten von eingestrahlttem und transmittiertem Licht ergibt sich dann

die Extinktion. Diese setzt sich aus der Absorption und der Streuung der Probe zusammen, wobei die beiden Anteile anhand der Spektren nicht separiert werden können. Für Lösungen chemischer Verbindungen, die aufgrund elektronischer Übergänge im betrachteten Spektralbereich absorbieren, besteht die Extinktion A im wesentlichen aus Absorption, sodass sie nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz proportional zur Konzentration der Lösung c , der Schichtdicke der durchstrahlten Probe d und einem für den jeweiligen Farbstoff spezifischen Extinktionskoeffizienten ε ist (Gl. 2.5). Dieser Zusammenhang wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Konzentration und damit der Reinheit des funktionalisierten Carotins verwendet.

$$A = \lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2.5)$$

Für Metallnanopartikel lässt sich der Anteil der Streuung an der Extinktion nicht vernachlässigen, da die Anregung von lokalisierten Oberflächenplasmonen in Metallnanostrukturen immer sowohl zu Streuung als auch zu Absorption im Bereich der Resonanzfrequenz der Plasmonen führt.^[84] Dennoch bieten Extinktionsspektren die Möglichkeit mit einer relativ einfachen Messung einen Überblick über die Eigenschaften der Metallnanostrukturen zu gewinnen. Zum Beispiel lassen sich anhand der Plasmonenbanden Partikelgrößen abschätzen.^[85] Teilweise kann auch die Bildung von Aggregaten anhand einer Rotverschiebung der Extinktionsbande beobachtet werden.^[86] Jedoch ist dies nicht absolut zuverlässig, da die Kopplung der Plasmonen der aggregierten Nanopartikel auch in sogenannten dunklen Moden resultieren kann, die bei einer Fernfeldanregung wie sie bei der Extinktionsspektroskopie stattfindet nicht beobachtbar sind, aber für die Verstärkung im SERS- bzw. SEHRS-Experiment eine hohe Relevanz haben können.^[87] In dieser Arbeit wurden Extinktionsspektren generell für eine grobe Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Strukturen zu Beginn der Experimente verwendet und insbesondere wurde die Tatsache genutzt, dass anhand der Extinktionsspektren die elektromagnetische Verstärkung im SERS- oder SEHRS-Experiment – ohne den Einfluss der chemischen Verstärkung – abgeschätzt werden kann.^[72,88] Dies wird in Kapitel 7 diskutiert.

Die Streuung der plasmonischen Nanopartikel kann auch zur Lokalisierung der Partikel mit Hilfe von optischer Dunkelfeldmikroskopie ausgenutzt werden. Dabei wird der Beleuchtungsstrahl in einem Mikroskop so gerichtet, dass er zwar die Probe erreicht, aber nicht vom Objektiv gesammelt wird.^[89] Auf diese Weise enthalten die Aufnahmen, die in einem solchen Mikroskop erhalten werden, wenig Hintergrund und es wird

ausschließlich das Rayleigh-Streulicht von der Probe, nicht aber deren Absorption, beobachtet.^[89]

Um Informationen über morphologische Eigenschaften der Nanostrukturen, insbesondere deren Größe und Form, zu erhalten, können elektronenmikroskopische Verfahren angewendet werden. Hierbei werden die extrem kurzen Wellenlängen von Elektronenstrahlen ausgenutzt, um die mikroskopische Auflösung erheblich zu verbessern, sodass Nanostrukturen erkennbar werden. Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) werden Bilder von Metallnanopartikeln im wesentlichen durch Wechselwirkung eines die Probe durchstrahlenden Elektronenstrahls mit den Atomkernen und eine daraus resultierende elastische Streuung der Elektronen erzeugt.^[90] Um ein Durchstrahlen der Proben zu ermöglichen, müssen die Proben allerdings sehr dünn sein, üblicherweise werden kolloidale Nanopartikel auf speziell angefertigte Gitter aufgebracht. Im Rasterelektronenmikroskop (engl. *scanning electron microscope*, SEM) hingegen werden die beim Abrastern der Probe mit dem Elektronenstrahl in alle Richtungen gestreuten Sekundärelektronen detektiert,^[90] sodass auch die Untersuchung dickerer Proben, z. B. der in dieser Arbeit verwendeten auf Glas immobilisierten Silbernanopartikel, möglich ist.

Für hochauflösende Elektronenmikroskopie müssen die Proben sich im Vakuum befinden. Um die Größe von Nanopartikeln in kolloidalen Lösungen zu untersuchen, kann die dynamische Lichtstreuung (DLS) in diesen Lösungen gemessen werden. Dies beruht auf der Tatsache, dass größere Partikel in einer Lösung langsamer diffundieren als kleinere Partikel, sodass die zeitliche Änderung der Rayleigh-Streuung dieser Partikel in einem definierten Betrachtungswinkel von der Größe der Partikel abhängig ist.^[91] Allerdings lassen sich keine Aussagen über die tatsächliche Größe der Nanopartikel machen, da aus DLS-Daten nur der sogenannte hydrodynamische Durchmesser ermittelbar ist, der die Nanopartikel und deren Solvathülle einschließt. Ein weiterer Nachteil der DLS für die in dieser Arbeit verwendeten, relativ polydispersen Nanopartikel ist, dass für die Ermittlung der Partikelgröße aus den Streudaten Näherungsverfahren verwendet werden müssen, die am besten für monodisperse Partikelverteilungen mit einheitlichen Partikelformen funktionieren.^[92]

Um Wechselwirkungen zwischen Metallnanopartikeln und Molekülen zu untersuchen, sind Kenntnisse über die Oberflächenladung der Nanopartikel hilfreich. Einen Hinweis auf die Oberflächenladung gibt das sogenannte Zeta-Potential, das die elektrische Spannung zwischen der Oberflächenladung und der beweglichen Solvathülle der

Partikel angibt.^[93] Das Zeta-Potential wird unter Berücksichtigung der Viskosität und der relativen Permittivität des Lösungsmittels aus der Geschwindigkeit der Partikel in einem äußeren elektrischen Feld berechnet, die anhand der Lichtstreuung bei Bewegung der Partikel in diesem Feld gemessen wird.^[94] Dabei bestehen für die hier verwendeten polydispersen Silbernanopartikel ähnliche Schwierigkeiten wie bei der DLS, da die unterschiedlichen Größen und Formen der Nanopartikel deren Bewegung auch im elektrischen Feld beeinflussen. Zudem wird die Bewegung der Partikel und damit die Zeta-Potentialmessung auch dann durch an der Oberfläche der Partikel gebundene Moleküle, z. B. Stabilisatoren, beeinflusst, wenn diese Moleküle keinen direkten Einfluss auf die Oberflächenladung haben.^[94]

2.2 Analytische Anwendungen der Raman-Streuung

Raman-Streuung hat ein großes Anwendungspotential in der Analytik, z. B. für archäologische und forensische Fragestellungen^[95] sowie in der biomedizinischen Diagnostik.^[96] In dieser Arbeit wurden einzelne Anwendungsbeispiele für SEHRS – die pH-Sensorik, die Untersuchung von Carotinoiden und die hyperspektrale Bildgebung – betrachtet, zu denen in den folgenden Abschnitten der Stand der Forschung dargestellt wird.

2.2.1 Lokale pH-Wert-Bestimmung mit SEHRS und SERS

In vielen dynamischen wässrigen Systemen ist es wichtig, lokale Unterschiede des pH-Wertes detektieren zu können. Dies gilt insbesondere für biologische Fragestellungen, bei denen der pH-Wert Hinweise auf lokale Veränderungen im Gewebe geben kann. Für diese Anforderung ist die oberflächenverstärkte Raman-Streuung eine interessante Option, da sie es ermöglicht, chemische Unterschiede selektiv ausschließlich in der unmittelbaren Nähe der Oberfläche von Metallnanostrukturen zu beobachten. Zwar ist die Oberfläche von Metallnanopartikeln selbst relativ unempfindlich gegenüber Änderungen des pH-Wertes der Umgebung – mit wenigen Ausnahmen, die in Kapitel 7 diskutiert werden. Aber es können Sondenmoleküle auf die Oberfläche aufgebracht werden, deren chemische Struktur und Wechselwirkung mit der Metalloberfläche sich bei unterschiedlichen pH-Werten unterscheiden. Zum einen können hierzu vom pH-Wert abhängige Konformationsänderungen ausgenutzt werden, die zu einer höheren Verstärkung des SERS-Signals bestimmter Gruppen im Molekül führen.^[97]

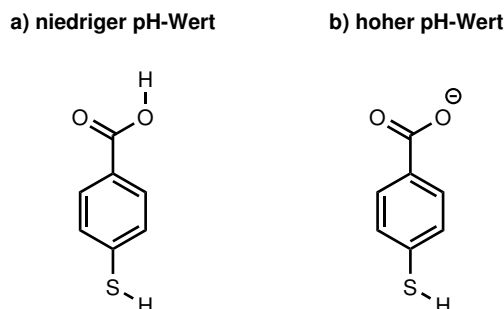


Abb. 2.2: Struktur von *para*-Mercaptobenzoessäure (a) in der protonierten Form bei niedrigem pH-Wert und (b) in der deprotonierten Form bei hohem pH-Wert.

Zum anderen können direkte Protonierung oder Deprotonierung der Sondenmoleküle zu Strukturänderungen führen, die anhand der Banden in den SERS-Spektren nachvollziehbar sind. Als Sonden für solche Experimente wurden bereits verschiedene pH-empfindliche Verbindungen diskutiert, z. B. Methylrot und Kresolrot,^[98] die auch als pH-Farbindikatoren gebräuchlich sind, Mercaptopyridin,^[99] und Aminothiophenol.^[100] Insbesondere *para*-Mercaptobenzoessäure (*p*MBA, Abb. 2.2), deren Thiolgruppe wie auch bei anderen organischen Tiole eine stabile Bindung der Moleküle an Silbernanopartikeloberflächen ermöglicht,^[27,101] und deren Carboxylgruppe eine hohe Empfindlichkeit der SERS-Spektren von *p*MBA gegenüber pH-Wert-Änderungen verursacht,^[25] ist für die pH-Wert-Bestimmung mit Hilfe von SERS gut geeignet. Die Orientierung der Moleküle relativ zur Oberfläche und damit auch eine eventuelle zusätzliche Wechselwirkung der Carboxylgruppe mit dem Metall ist von der Konzentration abhängig.^[25] Die freie Carboxylgruppe hat einen pK_a -Wert von 5^[102] und liegt demnach bei sehr niedrigen pH-Werten protoniert und bei höheren pH-Werten deprotoniert vor (Abb. 2.2). Grundsätzlich ist dies auch an der Metalloberfläche gegeben, allerdings können sich die pK_a -Werte durch Wechselwirkung mit der Oberfläche verschieben.^[81,103]

*p*MBA wurde bereits zur Untersuchung lokaler pH-Werte in Zellen mit Hilfe von SERS eingesetzt.^[22–24,26,27,104] Auch eine Anwendung in Verbindung mit SEHRS wurde vorgeschlagen, wobei festgestellt wurde, dass die unterscheidbaren pH-Bereiche bei SEHRS und SERS verschieden sein können.^[24]

Somit ist das pH-abhängige Verhalten des Systems aus Silbernanopartikeln und *p*MBA in SERS-Experimenten bereits gut untersucht. In dieser Arbeit wurde dieses System daher ausgenutzt, um verschiedene Silbernanopartikel hinsichtlich ihrer Eignung als SEHRS-Substrate zu vergleichen und um Umgebungseinflüsse auf SEHRS- und SERS-Spektren zu untersuchen (Kapitel 4 und 7).

2.2.2 Raman-Spektroskopie von Carotinoiden

Carotinoide sind langkettige Kohlenwasserstoffe, die aus Isoprenoid-Einheiten zusammengesetzt sind.^[105] Sie unterscheiden sich in der Länge der Polyenkette und in den Endgruppen. Aufgrund ihrer großen Bedeutung in der Natur und ihrer interessanten optischen Eigenschaften wurden Carotinoide in den vergangenen Jahrzehnten vielfach spektroskopisch untersucht.

Das konjugierte π -System in der Polyenkette führt dazu, dass Carotinoide im Bereich des sichtbaren Lichts absorbieren. Dies erklärt ihre Funktionen als Bestandteile der Photosysteme I und II in Pflanzen. Dort ergänzen sie in den Lichtsammelkomplexen die Chlorophylle und erweitern so den für die Photosynthese nutzbaren Spektralbereich des einfallenden Lichts.^[33] Gleichzeitig bieten sie durch Absorption und aufgrund ihres hohen Reduktionspotentials einfache Möglichkeiten Energie abzuführen und schützen somit die Photosysteme vor überschüssigem Licht.^[106]

Menschliche und tierische Organismen können Carotinoide nicht selbst herstellen, benötigen aber insbesondere β -Carotin als Vorläufer für Vitamin A und andere Retinoide, die für den Sehprozess wichtig sind,^[107,108] und als Antioxidans in der Haut.^[33]

Spektroskopische Untersuchungen ermöglichen Erkenntnisse über die Struktur, Zusammensetzung und Funktion der Carotinoide in den genannten biologischen Prozessen. Außerdem führen die energetisch niedrig liegenden elektronischen Zustände^[109] und die hohe molekulare Symmetrie der Carotinoide dazu, dass sie auch unabhängig von ihrer Bedeutung in der Natur interessante Systeme für verschiedene spektroskopische Methoden^[110] und insbesondere für die Resonanz-Raman-Spektroskopie darstellen. So wurden Raman-Anregungsprofile von β -Carotin unter verschiedenen Umgebungsbedingungen,^[34,35] sowie dessen Schwingungsspektren in Kombination mit Berechnungen der Molekülstruktur untersucht.^[36,111,112] Durch den starken Resonanzeffekt können resonante Raman-Spektren von β -Carotin bis hin zu nanomolaren Konzentrationen erhalten werden.^[37] Der Vergleich der Resonanz-Raman-Spektren verschiedener Carotinoide zeigt, dass die spektrale Signatur hauptsächlich durch Veränderungen in der Polyenkette, z. B. cis/trans-Isomerie, aber weniger durch unterschiedliche Endgruppen beeinflusst wird.^[113,114]

Bei der Analyse natürlicher Systeme, die Carotinoide enthalten, dient die Raman-Spektroskopie – bei Anregung sowohl in Resonanz als auch weit entfernt vom $\pi - \pi^*$ -Übergang – vor allem der Untersuchung der Zusammensetzung der Carotinoide^[115] oder ihrer Wechselwirkung mit der Umgebung,^[116,117] wobei insbesondere die Wechselwir-

kung und Orientierung von Carotinoiden in Lipidmembranen von Interesse ist,^[118,119] da sie deren Festigkeit beeinflussen.^[33] Außerdem lässt sich anhand von Raman-Spektren das chemische Verhalten von Carotinoiden unter Lichteinfluss in verschiedenen Matrices untersuchen.^[120,121]

Für eine möglichst schonende Analyse verschiedener Carotinoid enthaltender biologischer Proben, insbesondere zur Vermeidung der Veränderung der Proben durch photochemische Prozesse, ist die Anregung der Raman-Spektren mit Wellenlängen im nahen Infrarot vorzuziehen. Bei der Hyper-Raman-Spektroskopie kann man gleichzeitig Resonanzverstärkungseffekte durch den elektronischen Übergang der Carotinoide ausnutzen, da die Zweiphotonenstreuung bei Anregung im nahen Infrarot im sichtbaren Spektralbereich auftritt. In diesem Spektralbereich lässt sich der intensivste, ein- und zweiphotonenerlaubte, elektronische Übergang von β -Carotin anregen, neben dem es noch weitere, energetisch höher liegende Zweiphotonen erlaubte Übergänge gibt.^[122] In bisherigen Hyper-Raman-Experimenten wurde kristallines β -Carotin als Modell in der Hyper-Raman-Mikrospektroskopie verwendet.^[123] Des weiteren wurde in Resonanz-Hyper-Raman-Spektren organischer Lösungen von β -Carotin eine Verstärkung der (nicht-resonanten) Hyper-Raman-Streuung des Lösungsmittels beobachtet, die auf einer intermolekularen Kopplung zwischen Carotinmolekülen und benachbarten Lösungsmittelmolekülen beruht.^[124]

Von besonderem Interesse sind auch nicht-resonante Raman-Spektren von Carotinoiden, da auf diese Weise andere Schwingungen untersucht werden können, die bei resonanter Anregung neben den sehr dominanten, verstärkten Banden im Spektrum nur schwer zu beobachten sind. Außerdem ermöglicht der Vergleich von resonanten und nicht-resonanten Raman-Spektren eine Beurteilung des Ausmaßes der Resonanzverstärkung auf die verschiedenen Banden, was wiederum strukturelle Informationen über den elektronischen Übergang in den Molekülen bietet.^[28] Allerdings wurde für Carotinoide und andere vergleichbare Polyene bei Experimenten mit den entsprechenden Feststoffen auch bei Anregung der Raman-Spektren mit Wellenlängen, die weit entfernt vom elektronischen Übergang der Moleküle sind, ein Einfluss dieses Übergangs auf die Raman-Spektren beobachtet.^[38,125] Dieser Einfluss wurde mit einer Kopplung zwischen den π -Elektronen der einzelnen Moleküle und den Phononen des Molekülverbands im Festkörper, der aufgrund der delokalisierten π -Elektronen zum Teil metallische Eigenschaften hat, erklärt.^[125] Daher sollten die Carotinoide für Raman-Experimente, bei denen Einflüsse des elektronischen Übergangs ausgeschlossen

werden sollen, in Lösungen vorliegen. Im Hinblick darauf, dass die natürliche Umgebung der Carotinoide im wesentlichen aus Lipidmembranen oder Proteinstrukturen in wässriger Umgebung besteht, sind insbesondere Messungen in wässrigen Lösungen von Interesse. Aufgrund der Tendenz der Carotinoide, in Wasser molekulare Aggregate zu bilden, deren optische Eigenschaften sich deutlich von denen der Monomere unterscheiden,^[126,127] sollten diese Lösungen sehr geringe Konzentrationen aufweisen.

Um die Empfindlichkeit der Messungen, insbesondere bei nicht-resonanter Anregung, zu erhöhen, kann die Ausnutzung der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) von Vorteil sein. Diese benötigt eine große räumliche Nähe zwischen den zu untersuchenden Carotinmolekülen und der für die plasmonische Verstärkung verwendeten nanostrukturierten Metalloberfläche. Bei wässrigen Lösungen mit kolloidalen Metallnanopartikeln ist eine solche Nähe nur für Carotinoide mit hydrophilen Endgruppen,^[128] die eine gewisse Affinität zur Metalloberfläche aufweisen, ohne weiteres gegeben. Für hydrophobe Carotinoide, wie z. B. β -Carotin, ergibt sich somit einerseits die Möglichkeit, selektiv hydrophile Bestandteile komplexer Proben neben den Carotinoiden bei Verwendung von SERS bzw. die Carotinoide selbst unter Verwendung von Resonanzverstärkung, aber ohne plasmonische Verstärkung zu detektieren.^[129] Andererseits wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um die Affinität zwischen der Metalloberfläche und den Carotinoiden zu erhöhen, indem nanostrukturierte Silberoberflächen mit verschiedenen Alkanthiolen funktionalisiert wurden.^[130–132] Auf diese Weise wurde anhand von Untersuchungen der Abstandsabhängigkeit der Oberflächenverstärkung festgestellt, dass die Resonanz-Raman-Streuung von β -Carotin auf Silberoberflächen vor allem elektromagnetisch ist und kaum Einfluss durch chemische Verstärkung besteht.^[133] Ergänzend dazu zeigen Emissionsspektren von Silberoberflächen nach Aufbringen einer β -Carotin-Schicht, dass eine Kopplung zwischen den Plasmonen des Silbers und dem starken elektronischen Übergang des Carotins stattfindet.^[134] Um eine solche Kopplung zu untersuchen, können SERS-Spektren ebenfalls hilfreich sein.^[31,32]

In dieser Arbeit wurde ein neuer Ansatz verfolgt, um die Affinität zwischen β -Carotin und Silbernanopartikeln zu erhöhen: die Verwendung eines thiofunktionalisierten Carotins, 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin (**5** in Abb. 2.3). Dieses Carotinthiol bindet an Goldoberflächen über die Thiolgruppe.^[137] Da Schwefel zu Silber eine ähnlich hohe Affinität hat wie zu Gold und viele organische Thiole auch auf Silberoberflächen über die Thiolgruppe chemisorbieren,^[101,138,139] wurde dieses Verhalten auch für

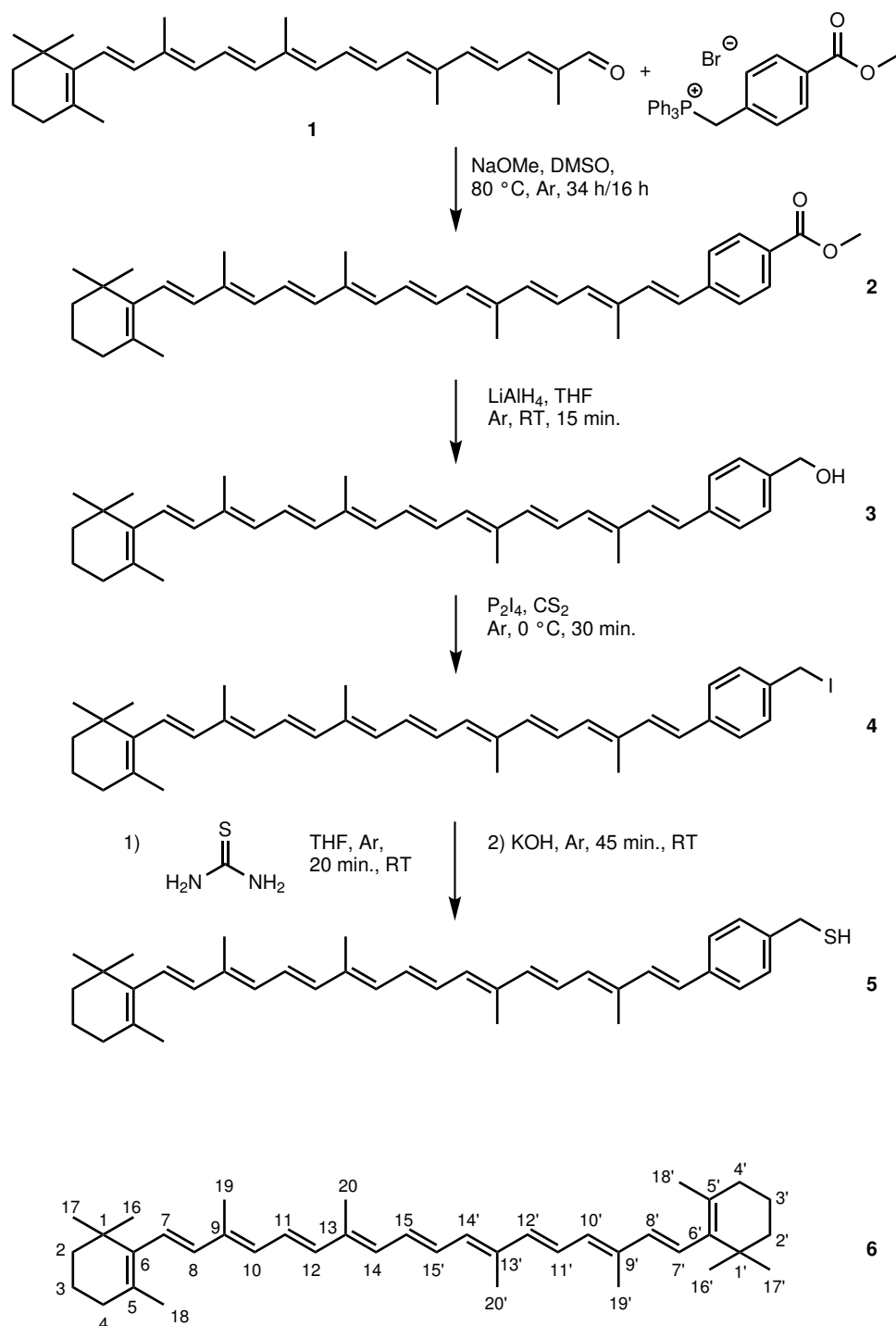


Abb. 2.3: Syntheseweg zur Herstellung von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)-β-carotin (5) aus 8'-Apo-β-carotinal (1) nach [135, 136] und die Struktur des nicht funktionalisierten β-Carotins (6) zum Vergleich. Die Zahlen an der Struktur von (6) zeigen die Nummerierung der Kohlenstoffatome nach IUPAC-Nomenklatur,^[105] wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wird.

7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin auf Silbernanopartikeln erwartet.

Das Carotinthiol wurde ausgehend von 8'-Apo- β -carotinal (**1**) hergestellt (Abb. 2.3). In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass in einer Wittig-Reaktion der Methyl ester **2** hergestellt und anschließend zum Alkohol **3** reduziert werden kann.^[135] Ausgehend von diesem können in aufeinanderfolgenden nucleophilen Substitutionen zunächst das Iodid **4**^[135] und schließlich das Thiol **5**^[136] hergestellt werden. Das Thiol **5** wurde in dieser Arbeit in SEHRS- und SERS-Experimenten im Vergleich zu nicht-funktionalisiertem β -Carotin **6** (Abb. 2.3) untersucht (Kapitel 5).

2.2.3 Möglichkeiten für die multivariate Analyse von SEHRS-Spektren zur Bildgebung

Für die breite Anwendbarkeit einer analytischen Methode sollte immer auch die Möglichkeit gegeben sein, komplexe Gemische und die lokale Verteilung ihrer Bestandteile zu untersuchen. Ein SEHRS-Spektrum enthält, ebenso wie andere Schwingungsspektren, eine für die in der Probe enthaltenen Bestandteile spezifische Signatur. Aus einer solchen Signatur können in univariaten Untersuchungen, die auf der Betrachtung der Intensitäten oder Intensitätsverhältnisse ausgewählter Banden basieren, Informationen über die Zusammensetzung einer Probe erhalten werden, wie für einphotonenangeregte SERS-Spektren bereits bekannt ist.^[140] Hierfür müssen allerdings die zu untersuchenden Bestandteile im Vorhinein bekannt sein und ihre Spektren müssen sich ausreichend unterscheiden, um eine eindeutige Klassifizierung zu ermöglichen. Mit multivariaten Verfahren hingegen kann die gesamte in den Spektren vorhandene Information verwendet werden, wodurch auch feinere Unterschiede erkennbar werden.^[141] Dies findet in der Analytik zur Trennung komplexer Gemische anhand von Raman-, Infrarot- und SERS-Spektren bereits verbreitete Anwendung^[142–145] und ist auch für die hyperspektrale Bildgebung, also Bildgebung basierend auf einer Vielzahl von Datenpunkten pro Spektrum, anhand von Raman- und SERS-Spektren nützlich.^[39–41,146]

SEHRS und Hyper-Raman-Streuung folgen anderen Auswahlregeln als die oben genannten schwingungsspektroskopischen Methoden (siehe Abschnitt 2.1). In mikroskopischen Anwendungen wird SEHRS aus einem stark begrenzten Probevolumen von wenigen Femtolitern erhalten (siehe S. 43 f.). Daher sind Untersuchungen von lokalen Verteilungen verschiedener Analyten mit sehr hoher Ortsauflösung denkbar. SEHRS könnte somit in der bildgebenden Analytik zusätzliche Informationen liefern. Es wur-

de bereits gezeigt, dass SEHRS-Spektren von komplexen Gemischen in biologischen Proben erhalten werden können,^[147] dass univariate Hyper-Raman-Bildgebung (ohne Oberflächenverstärkung) basierend auf der Intensität einer einzelnen Bande möglich ist^[123] und dass deuterierte und protonierte Formen eines Analyten anhand der Intensitäten der zueinander verschobenen Banden in ihren SEHRS-Spektren unterscheidbar sind.^[148] Ansonsten waren die bisherigen SEHRS-Untersuchungen jedoch im wesentlichen auf einzelne chemische Verbindungen konzentriert,^[10,75,76,149,150] was sich mit den geringen Streuquerschnitten, den dadurch oftmals langen Integrationszeiten und dem Bedürfnis, zunächst den SEHRS-Effekt an sich besser zu verstehen, erklären lässt. Daher wurden in dieser Arbeit anhand verschiedener einfacher Modellsysteme grundlegende Untersuchungen zur Bildgebung basierend auf einer Kombination aus SEHRS- und SERS-Spektren durchgeführt, die in Kapitel 6 diskutiert werden. Zunächst wurden univariate Unterscheidungen betrachtet und in einem zweiten Schritt multivariate Verfahren, die Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*, PCA) und die hierarchische Clusteranalyse (HCA), zur Klassifizierung verwendet.

Bei der PCA wird die Varianz innerhalb eines Datensatzes untersucht. Dazu wird ein neues Koordinatensystem definiert, dessen Achsen – die sogenannten Hauptkomponenten – basierend auf einer Varianzgewichtung konstruiert werden. Die erste Hauptkomponente entspricht also der größten Varianz des gesamten Datensatzes, die zweite Hauptkomponente der größten Varianz der dann noch verbleibenden Daten usw. Die Hauptkomponenten sind orthogonal zueinander und werden durch sogenannte *Scores* und *Loadings* definiert. Die Loadings geben dabei die Richtung der Varianz einer Hauptkomponente an und die Scores sind die Projektionen der Originaldaten auf die entsprechende Hauptkomponente.^[141] Damit lässt sich die Matrix der Originaldaten \mathbf{X} durch die Scores-Matrix \mathbf{T} und die Loadings-Matrix \mathbf{P} beschreiben (Gl. 2.6).^[151]

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{R} \quad (2.6)$$

Werden weniger Hauptkomponenten gebildet als Originalvariablen (hier: Datenpunkte in den Spektren) vorhanden waren, verbleibt zusätzlich eine Residuenmatrix \mathbf{R} , die die übrige Varianz des Datensatzes, üblicherweise das Rauschen, enthält. Daran ist der große Vorteil der PCA erkennbar, der in einer Datenreduktion auf die wesentlichen Unterschiede in einem Satz von Daten bzw. Spektren besteht. Da in den Loadings die Information über die Variablen bzw. Datenpunkte mit der höchsten Varianz enthalten ist, kann in einer PCA von Spektren außerdem erkannt werden, welche Banden,

und damit welche chemischen Bestandteile einer Probe, für die Unterscheidung verschiedener Proben verantwortlich sind.^[151]

Die HCA basiert, im Gegensatz zur PCA, nicht auf Unterschieden, sondern auf Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Spektren. Dabei werden die Spektren als n-dimensionale Vektoren betrachtet, deren Abstände zueinander berechnet werden. Anschließend werden basierend auf diesen Abständen iterativ Gruppen (Cluster) gebildet.^[143] Für die Berechnung der Abstände und die Bildung der Gruppen gibt es verschiedene Algorithmen. In dieser Arbeit wurden die Abstände als euklidische Abstände berechnet. Die Gruppierung der Spektren erfolgte nach dem Algorithmus von Ward, der in jedem Schritt für alle möglichen Kombinationen die Summe der quadratischen Abweichungen vom Mittelwert des Clusters, der bei einer Gruppierung neu gebildet würde, berechnet und dann diejenige Gruppierung vornimmt, bei der dieser Wert minimal ist.^[152]

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden kommerziell erworben und direkt ohne weitere Bearbeitung verwendet. 3-Aminopropyltriethoxysilan (98 %), 4-Carbomethoxybenzyltriphenylphosphoniumbromid (98 %), wasserfreies Dichlormethan (99,9 %), wasserfreies *n*-Hexan und Natriumsulfat (wasserfrei, 99 %) wurden von der ABCR GmbH erworben. 8'-Apo- β -carotinal (≥ 96 %), Chloroform-*d* (99,8 atom % D, wasserfrei), wasserfreies Dimethylsulfoxid (≥ 99 %), Dinatriumhydrogenphosphat (99 %), Diphosphortetraiodid (95 %), Hydroxylaminhydrochlorid (99 %), wasserfreies Kohlenstoffdisulfid (≥ 99 %), Lithiumaluminiumhydrid (1 mol L⁻¹ in Tetrahydrofuran), Natriumhydroxid (p. a.), Natriummethoxid (95 %), *para*-Aminothiophenol (97 %), *para*-Mercaptobenzoessäure (99 %), Polystyren-Partikel (3 μ m Durchmesser, wässrige Dispersion, 10 % (m/m) Feststoffe), Silbernitrat (99,9999 %) und Thioharnstoff (≥ 99 %) wurden von der Firma Sigma-Aldrich erworben. Adenin (99 %), β -Carotin (> 97 %) und Cytosin (≥ 99 %) wurden von Fluka erworben. Kaliumcarbonat (≥ 99 %), Kaliumdihydrogenphosphat (p. a.), Kaliumhydroxid (85 %), Kieselgel 60 (Korngröße 0,2-0,5 mm, 35-70 mesh), und Natriumchlorid (99,99 %) wurden von der Merck KGaA erworben. Kristallviolett, Natriumborhydrid (98 %), Salzsäure (37 %) und Schwefelsäure (95-97 %) wurden von J. T. Baker[®] verwendet. Magnesiumsulfat-Hydrat (getrocknet, ≥ 99 %) wurde von Riedel-de Haën[®] verwendet. Malachitgrün-Hydrochlorid wurde von Aldrich erworben. Wasserfreies Tetrahydrofuran (99,9 %, stabilisiert mit Butylhydroxytoluol) wurde von der Firma Acros Organics erworben. Trinatriumcitrat-Dihydrat (99 %) wurde von der Th. Geyer & Co KG erworben. Wasserstoffperoxid (30 %) wurde von der Firma Carl Roth

GmbH & Co KG erworben. Nicht wasserfreie Lösungsmittel wurden in einer Reinheit von $\geq 97\%$ von der Firma Stockmeier erworben.

Analytlösungen Für die Herstellung aller wässrigen Lösungen wurde Millipore-Wasser ($0,055\ \mu\text{S cm}^{-1}$) aus einer Reinstwasseranlage der Firma USF Elga (Purelab Plus) verwendet. Für die Herstellung von Lösungen der Carotine wurde wasserfreies Ethanol ($\geq 99\%$) verwendet. Zur Herstellung wässriger Lösungen von Kristallviolett, *p*MBA und *p*ATP wurden zunächst Stammlösungen der Konzentration $10^{-2}\ \text{mol L}^{-1}$ in Methanol hergestellt, die dann mit Wasser verdünnt wurden. Alle anderen wässrigen Lösungen wurden direkt in Wasser angesetzt.

pH-Pufferlösungen bei pH-Werten von 5 bis 8 wurden nach einem Protokoll von Sörensen^[153] aus $0,1\ \text{mol L}^{-1}$ Lösungen von Kaliumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat hergestellt. Lösungen mit pH-Werten zwischen 2 und 4 wurden durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure zu der Pufferlösung mit einem pH-Wert von 5, Lösungen mit pH-Werten zwischen 9 und 12 durch Zugabe von gesättigter Natriumhydroxidlösung zu der Pufferlösung mit einem pH-Wert von 8 hergestellt. Die pH-Werte wurden mit einem digitalen pH-Meter (Cyberscan pH310, Eutech Instruments) überprüft.

3.2 Herstellung und Immobilisierung der Silbernanopartikel

Alle in dieser Arbeit verwendeten kolloidalen Silbernanopartikellösungen wurden durch Reduktion von Silberionen in wässriger (Millipore-Wasser, $0,055\ \mu\text{S cm}^{-1}$) Lösung hergestellt. Die Lösungen wurden sowohl während der Herstellung als auch zur Lagerung durch Abdecken mit Aluminiumfolie vor Lichteinfluss geschützt.

Reduktion mit Citrat^[154] Eine Lösung von 45 mg ($0,3\ \text{mmol}$) Silbernitrat in 245 mL Wasser wurde unter Rühren auf $85\ ^\circ\text{C}$ erhitzt. Nach der Zugabe einer Lösung von 58 mg ($0,2\ \text{mmol}$) Trinatriumcitrat-Dihydrat in 5 mL Wasser wurde die Mischung für 1 Stunde unter Rühren sieden gelassen.

Reduktion mit Hydroxylamin^[155] Zu einer Lösung von 12 mg (0,3 mmol) Natriumhydroxid und 11 mg (0,2 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 90 mL Wasser wurde unter Rühren eine Lösung von 17 mg (0,1 mmol) Silbernitrat in 10 mL Wasser gegeben. Die resultierende Mischung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Reduktion mit Natriumborhydrid, I^[156] Die Silbernanopartikel wurden nach dieser Methode von Tina Büchner hergestellt. Eine Lösung von 4 mg (0,02 mmol) Silbernitrat in 250 mL Wasser wurde auf 4 °C gekühlt. Dann wurden unter Rühren nacheinander 257 mg (0,9 mmol) Trinatriumcitrat-Dihydrat und eine frisch hergestellte konzentrierte wässrige Lösung von $1,25 \cdot 10^{-3}$ mmol Natriumborhydrid zugegeben. Die resultierende Mischung wurde für 30 Minuten bei 4 °C und anschließend für 4 Stunden bei 70 °C gerührt.

Reduktion mit Natriumborhydrid, II^[157] Die Silbernanopartikel wurden nach dieser Methode von Sebastian Fredrich hergestellt. Eine Lösung von 1 mg (0,005 mmol) Silbernitrat in 6,5 mL Wasser wurde auf 0 °C gekühlt. Dann wurden unter Rühren 7 mg (0,03 mmol) Trinatriumcitrat-Dihydrat zugegeben. Nach der Zugabe von einer ebenfalls auf 0 °C gekühlten Lösung von 1 mg (0,03 mmol) Natriumborhydrid in 0,35 mL Wasser wurde die Mischung weitere 30 Minuten bei 0 °C gerührt.

Immobilisierung der Silbernanopartikel auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) funktionalisierten Glasträgern^[69] Für die Immobilisierung der Silbernanopartikel wurden Mikroskopiedeckgläser als Träger verwendet. Die Gläser wurden zunächst in einer Mischung aus 30 % Wasserstoffperoxid und konzentrierter Schwefelsäure (4:1, v/v) gereinigt und mit Wasser gespült. Anschließend wurden sie für 30 Minuten in eine 20 %ige (v/v) wässrige Lösung von APTES gelegt. Überschüssiges APTES wurde durch Spülen mit Wasser in einem langsamen Strom für 20 Minuten entfernt. Danach wurden die Glasplättchen nacheinander für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur und bei 110 °C getrocknet. Nach kurzem Abkühlen wurden die funktionalisierten Gläser über Nacht in die kolloidale Silbernanopartikellösung gelegt.

Strukturiertes Aufbringen von Analytmolekülen auf den immobilisierten Nanopartikeln Sollten Analytmoleküle gleichzeitig mit den Nanopartikeln auf die Oberflächen aufgebracht werden, wurden die mit APTES funktionalisierten Glasträger senkrecht in eine Mischung aus kolloidaler Nanopartikellösung und Analytlösung (10:1,

v/v) getaucht. Während der Glasträger eingetaucht war (über Nacht) wurde die Lösung gerührt. Als Analytmoleküle wurden mit dieser Vorgehensweise die beiden Nukleobasen Adenin und Cytosin verwendet (Endkonzentration in der Mischung $9 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$).

Die nachträgliche Analytstrukturierung auf den immobilisierten Silbernanopartikeln erfolgte durch Eintauchen in die entsprechenden Lösungen für jeweils 30 Minuten. Vor und nach jedem Eintauchschritt wurden die Glasträger an der Luft vollständig trocknen gelassen um Diffusionseffekte zu vermeiden.

Als weitere Strukturierungsmethode wurden Experimente mit einem Kontaktpotter (BioOdysseyTM CalligrapherTM Miniarrayer, BIO-RAD) durchgeführt. Dabei wurden Tropfen von wässrigen Analytlösungen der Konzentration $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ in Abständen von 400 μm auf der Oberfläche aufgebracht.

Immobilisierung von Silbernanopartikeln unter Zuhilfenahme von Polystyrenmikropartikeln als Template Die kommerziell erhaltenen Polystyrenpartikel wurden zunächst durch Zentrifugation gereinigt, um überschüssige Stabilisatormoleküle zu entfernen.^[158] Dazu wurde die ursprüngliche Suspension mit Wasser auf 0,1 % Feststoffgehalt ($7 \cdot 10^{10} \text{ Partikel L}^{-1}$) verdünnt und für 5 Minuten bei 7540 g zentrifugiert (Centrifuge 5430, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und der feste Rückstand in Wasser resuspendiert. Dieser Vorgang wurde 8 Mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Polystyrenpartikel in einem Zehntel des Wasservolumens resuspendiert, um einen Feststoffgehalt von 1 % zu erhalten. 1 mL der resultierenden Suspension wurde mit 4 mL einer kolloidalen Silbernanopartikellösung, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurde, gemischt. In diese Lösung (Endkonzentration der Polystyrenpartikel: $1,4 \cdot 10^{10} \text{ Partikel L}^{-1}$, Endkonzentration der Silbernanopartikel: $3 \cdot 10^{14} \text{ Partikel L}^{-1}$) wurde über Nacht ein mit APTES funktionalisiertes Glasplättchen (Funktionalisierung wie oben für die Immobilisierung der Nanopartikel beschrieben) gelegt. Nach dem Herausnehmen aus der Partikelmischung wurde das Glasplättchen mit Toluol, Aceton oder Tetrahydrofuran gespült.

In situ Herstellung von Silbernanopartikeln in Zwiebelgewebe Die Herstellung der Nanopartikel in Zwiebelgewebe erfolgte durch Marta Espina Palanco an der DTU Kopenhagen. Etwa 1 cm^2 große Stücke einer einzelnen Schicht einer roten Zwiebel (*Allium cepa*) wurden für 20 Stunden bei Raumtemperatur und im Dunkeln in eine $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ Lösung von Silbernitrat in Wasser gelegt. Anschließend wurden sie mit

Leitungswasser gespült und für mehrere Stunden auf einem Glasobjektträger (geschützt vor Licht) trocknen lassen.

3.3 Herstellung des thiofunktionalisierten Carotins

Die Carotinoide wurden bei allen Syntheseschritten nach Möglichkeit durch Abdecken mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Die Lagerung erfolgte unter Argonatmosphäre bei -20 °C. Die Strukturen der Zwischen- und Endprodukte sind in Abb. 2.3 auf S. 31 dargestellt.

7'-Apo-7'-(4-carbomethoxyphenyl)- β -carotin (2)^[135] 8'-Apo- β -carotinal (**1**, 1 g; 2,4 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in 50 mL wasserfreiem Dimethylsulfoxid gelöst. Anschließend wurden 1,4 g (2,9 mmol) 4-Carbomethoxybenzyltriphenylphosphoniumbromid und 0,17 g (3,1 mmol) Natriummethoxid zugegeben. Die Mischung wurde für 34 Stunden bei 80 °C unter Feuchtigkeitsausschluss gerührt, wobei nach der Hälfte der Zeit 1,18 g (2,4 mmol) des Phosphoniumbromids und 0,14 g (2,6 mmol) Natriummethoxid zugegeben wurden. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt und in 800 mL Diethylether gegossen. Die entstandene Mischung wurde in zwei gleiche Teile aufgeteilt und beide Teile wurden sechs Mal mit je 75 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol/Dichlormethan umkristallisiert. Nach Trocknung am Vakuum für 1 h wurden 216 mg **2** (0,4 mmol, 17 % Ausbeute) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 1,03 (s, 5H, 16-, 17-CH₃), 1,05 (s, 1H, 16-, 17-CH₃), 1,47 (m, 2H, 2-CH₂), 1,62 (m, 4H, 3-CH₂), 1,72 (s, 3H, 18-CH₃), 1,98 (s, 3H, 20'-CH₃), 1,99 (s, 6H, 20-, 19-CH₃), 2,02 (m, 2H, 4-CH₂), 2,05 (s, 3H, 19'-CH₃), 3,91 (s, 3H, -O-CH₃), 6,13 (d, J = 16,1 Hz, 1H, 8-CH), 6,16 (d, J = 11,9 Hz, 1H, 10-CH), 6,18 (d, J = 17,1 Hz, 1H, 7-CH), 6,26 (d, J = 10,5 Hz, 1H, 14-CH), 6,31 (d, J = 9,0 Hz, 1H, 14'-CH), 6,36 (d, J = 14,9 Hz, 1H, 12-CH), 6,39 (d, J = 11,6 Hz, 1H, 10'-CH), 6,45 (d, J = 14,5 Hz, 1H, 12'-CH), 6,58 (d, J = 15,8 Hz, 1H, 7'-CH), 6,63-6,69 (m, 4H, 15-, 11'-, 15'-, 11-CH), 6,99 (d, J = 15,9 Hz, 1H, 8'-CH), 7,47 (d, J = 8,1 Hz, 2H, Ar-H), 7,51-7,56 (m, 3H), 7,67 (d, J = 12,0 Hz, 2H), 7,68 (d, J = 11,9 Hz, 2H), 7,97 (d, J = 8,4 Hz, 2H, Ar-H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 12,77 (19-, 20-C), 12,82 (19'-, 20'-C),

19,26 (3-C), 21,76 (18-C), 28,97, 33,11 (4-C), 34,27 (1-C), 38,72, 39,65 (2-, 16-, 17-C), 52,00 (-O-CH₃), 124,60 (11'-C), 125,35 (11-C), 126,02 (7'-C), 126,10 (C-Ar), 126,81 (7-C), 128,25, 128,44, 128,53, 128,79, 129,43 (5-C), 129,58 (C-Ar), 129,79 (15'-C), 129,98 (C-Ar), 130,77 (10-C, 15-C), 131,91, 132,05, 132,13, 132,30 (14-C), 133,73 (14'-C), 134,83 (10'-C), 134,99 (9'-C), 136,13 (13'-, 8'-C), 136,26 (9-C), 137,03 (13-C), 137,12 (12-C), 137,73 (8-C), 137,90 (6-C), 139,26 (12'-C), 142,39 (C-Ar), 166,94 (C=O).

7'-Apo-7'-(4-hydroxymethylphenyl)- β -carotin (3)^[135] 310 mg (0,6 mmol) **2** wurden in 60 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Anschließend wurden 0,58 mL einer 1 mol L⁻¹ Lösung von Lithiumaluminiumhydrid in THF zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt und anschließend in 150 mL Wasser gegossen. Die wässrige Mischung wurde drei Mal mit je 75 mL Dichlormethan extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Umkristallisation aus Dichlormethan/Methanol wurden 85 mg **3** (0,16 mmol, 27 % Ausbeute) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 0,07 (s, 3H), 1,03 (s, 6H, 16-, 17-CH₃), 1,47 (m, 2H, 2-CH₂), 1,61 (m, 8H, 3-CH₂), 1,72 (s, 3H, 18-CH₃), 1,98 (s, 9H, 20'-, 19-, 20-CH₃), 2,02 (m, 2H, 4-CH₂), 2,04 (s, 3H, 19'-CH₃), 4,68 (s, 2H, -CH₂-OH), 6,13 (d, J = 15,8 Hz, 1H, 8-CH), 6,16 (d, J = 8,5 Hz, 1H, 10-CH), 6,18 (d, J = 16,3 Hz, 1H, 7-CH), 6,26 (d, J = 9,9 Hz, 1H, 14-CH), 6,29 (d, J = 10,2 Hz, 1H, 14'-CH), 6,34 (d, J = 11,4 Hz, 1H, 10'-CH), 6,36 (d, J = 14,9 Hz, 1H, 12-CH), 6,42 (d, J = 14,9 Hz, 1H, 12'-CH), 6,58 (d, J = 16,0 Hz, 1H, 8'-CH), 6,63-6,69 (m, 4H, 15'-, 15-, 11'-, 11-CH), 6,90 (d, J = 15,9 Hz, 1H, 7'-CH), 7,31 (d, J = 8,2 Hz, 2H, Ar-H), 7,42 (d, J = 8,2 Hz, 2H, Ar-H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 1,00, 12,80 (19-, 20-, 19'-, 20'-C), 19,25 (3-C), 21,76 (18-C), 28,97, 33,11 (4-C), 34,27 (1-C), 39,64 (2-C, 16-, 17-C), 65,18 (-CH₂-OH), 124,81 (11'-C), 125,21 (11-C), 126,46 (C-Ar), 126,74 (7-C), 126,89 (7'-C), 127,39, 129,41 (5-C), 129,88 (15-C), 129,99 (C-Ar), 130,43 (15'-C), 130,81 (13'-, 10-C), 132,04 (13-C), 132,35 (14'-C), 133,20 (14-C), 133,34 (10'-C), 133,74 (8'-C), 135,36 (9'-C), 136,15 (C-Ar), 136,29, 136,80 (C-Ar), 137,17 (12-C), 137,33 (C-Ar), 137,73 (8-C), 137,90 (6-C), 138,38 (9-C), 139,70 (12'-C).

7'-Apo-7'-(4-iodomethylphenyl)- β -carotin (4)^[135] 33 mg (0,06 mmol) Diphosphortetraiodid wurden in 9,3 mL wasserfreiem Kohlenstoffdisulfid gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und es wurden 93 mg (0,18 mmol) **3** zugegeben. Nach 45 Minuten wurde die Reaktionsmischung in 30 mL gesättigte Kaliumcarbonatlösung gegossen. Die wässrige Mischung wurde vier Mal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde durch Kieselgur („Filter Aid Celite Hyflo Super Cell“, ABCR GmbH) filtriert, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 56 mg (0,09 mmol, 50 %) **4** erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 0,07 (s, 7H), 0,87-0,94 (m, 11H), 1,02 (s, 6H, 16-CH₃, 17-CH₃), 1,25 (s, 2H), 1,27-1,38 (m, 12H), 1,39-1,44 (m, 5H), 1,47 (m, 3H, 2-CH₂), 1,62 (m, 4H, 3-CH₂, Wasser), 1,67 (m, 3H), 1,72 (s, 3H, 18-CH₃), 1,98 (s, 9H, 20'-CH₃, 19-CH₃, 20-CH₃), 2,01 (m, 3H, 4-CH₂), 2,04 (s, 4H, 19'-CH₃), 4,22 (m, 3H), 4,48 (s, 2H, Ar-CH₂-I), 6,13 (d, J = 16,1 Hz, 1H, 8-CH), 6,15 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 10-CH), 6,18 (d, J = 15,4 Hz, 1H, 7-CH), 6,26 (d, J = 9,9 Hz, 1H, 14-CH), 6,30 (d, J = 8,3 Hz, 1H, 14'-CH), 6,34-6,37 (m, 2H, 10'-CH, 12-CH), 6,43 (d, J = 15,7 Hz, 1H, 12'-CH), 6,53 (d, J = 16,1 Hz, 1H, 8'-CH), 6,63-6,69 (m, 4H, 15'-CH, 15-CH, 11'-CH, 11-CH), 6,90 (d, J = 15,9 Hz, 1H, 7'-CH), 7,32 (d, J = 8,5 Hz, 2H, Ar-H), 7,35 (d, J = 8,7 Hz, 2H, Ar-H), 7,53 (m, 1H), 7,70 (m, 1H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 1,01, 6,28, 10,96, 12,79 (19-C, 20-C), 12,85 (19'-C, 20'-C), 14,05, 19,26 (3-C), 21,77 (18-C), 22,98, 23,73, 28,92, 28,98, 30,31, 30,35, 33,12 (4-C), 34,27 (1-C), 38,72, 39,65 (2-C, 16-C, 17-C), 68,15 (Ar-CH₂-I), 124,79 (11'-C), 125,26 (11-C), 126,68 (7-C), 126,93 (7'-C), 128,79, 129,10, 129,42 (5-C), 129,87 (15-C), 130,52 (15'-C), 130,88 (13'-C, 10-C), 132,35 (14'-C), 132,44 (13-C), 133,33 (10'-C), 133,68 (8'-C), 134,20, 136,87 (C-Ar), 137,58 (C-Ar), 137,75 (8-C), 137,91 (6-C), 137,98 (9-C), 138,59 (12'-C), 167,76.

7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin (5)^[136] 49 mg (0,08 mmol) **4** wurden in 20 mL wasserfreiem THF gelöst und zu 246 mg (3,23 mmol) Thioharnstoff in 5 mL wasserfreiem THF gegeben. Die entstandene Mischung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt, dann wurden 307 mg (5,48 mmol) pulverisiertes Kaliumhydroxid zugegeben und für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 60 mL Wasser verdünnt und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das

Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Gradient von *n*-Hexan:Dichlormethan 80:20 bis 100 % Dichlormethan). Es wurden 15 mg (0,03 mmol, 38 %) **5** erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 0,07 (s, 12H), 0,78-0,86 (m, 24H), 0,87-0,94 (m, 41H), 1,04 (s, 6H, 16-CH₃, 17-CH₃), 1,25 (s, 13H), 1,27-1,37 (m, 43H), 1,41 (m, 14H), 1,47 (m, 2H, 2-CH₂), 1,56 (s, 19H, Wasser), 1,62 (m, 3H, 3-CH₂), 1,65-1,70 (m, 8H), 1,72 (s, 3H, 18-CH₃), 1,76 (s, 1H), 1,98 (s, 9H, 19-CH₃, 20-CH₃, 20'-CH₃), 2,02 (m, 3H, 4-CH₂), 2,04 (s, 3H, 19'-CH₃), 3,62 (s, 2H, Ar-CH₂-SH), 3,98 (m, 1H), 4,22 (m, 10H), 6,13 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, 8-CH), 6,15 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, 10-CH), 6,18 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H, 7-CH), 6,25 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, 14'-CH), 6,29 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, 14-CH), 6,34 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H, 10'-CH), 6,35 (d, *J* = 14,7 Hz, 1H, 12-CH), 6,42 (d, *J* = 15,0 Hz, 1H, 12'-CH), 6,56 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, 7'-CH), 6,61-6,70 (m, 4H, 15-CH, 15'-CH, 11-CH, 11'-CH), 6,89 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, 8'-CH), 7,18 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, Ar-H), 7,37 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, Ar-H), 7,53 (m, 4H), 7,71 (m, 4H).

Bestimmung der Konzentration des Carotinthiols Um das Verhältnis von **5** zu Verunreinigungen abzuschätzen und Lösungen von bekannter Konzentration für die geplanten SERS-Experimente zu erhalten, wurden 9 mg des Syntheseprodukts in ca. 2 mL Dichlormethan gelöst. Ein Teil dieser Lösung wurde im Verhältnis 1:1000 (v/v) mit Dichlormethan verdünnt um Extinktionsspektren zu messen. Anhand der Extinktion im Maximum bei 472 nm wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten des Carotinthiols^[137] die Konzentration der Lösung berechnet. Der übrige Teil der Stammlösung wurde in Aliquote von je 200 μ L aufgeteilt, die eingetrocknet wurden. Die festen Rückstände wurden bei -20 °C gelagert, um bei Bedarf Lösungen in verschiedenen Lösungsmitteln daraus herzustellen.

3.4 Raman- und Hyper-Raman-Experimente

Raman- und Hyper-Raman-Experimente wurden an mikrospektroskopischen Messaufbauten durchgeführt. Als Anregungsquellen dienten die in Tabelle 3.1 beschriebenen Laser.

Das Anregungslicht wurde mit Hilfe verschiedener Objektive auf die Proben fokussiert und das Streulicht jeweils mit demselben Objektiv gesammelt. Die einzige Aus-

Tabelle 3.1: Anregungslaser für die Raman- und Hyper-Raman-Experimente.

| Wellenlänge [nm] | Laserart | Leistung [mW] ^a |
|------------------|---|----------------------------|
| 405 | Diodenlaser (DL-100, Toptica Photonics AG) | 1-4 |
| 514 | Argon-Ionen-Laser (Melles Griot) | 0,2 |
| 532 | Diodengepumpte Festkörperlaser (BWI-532-100E, B & W Tec, Inc. bzw. Millenia 15SJ, Newport Spectra Physics), außer bei Experimenten mit immobilisierten Silbernanopartikeln und Nanopartikeln in Zwiebelgewebe, für die die zweite Harmonische des modengekoppelten 1064-nm Lasers (s.u.) verwendet wurde. | 0,2-10 |
| 785 | Diodenlaser (DL-100, Toptica Photonics AG) | 4-40 |
| 1064 | Modengekoppelter Nd:YVO ₄ -Laser, Pulslänge 7 ps, Pulswiederholrate: 76 MHz (picoTrain, HighQ GmbH) | 4-500 |

^a Bereich der verwendeten mittleren Leistungen an der Probe. Die Bestrahlungsstärken für die einzelnen Experimente sind in den Kapiteln 4 bis 7 bei den jeweiligen Spektren vermerkt.

nahme bilden die Experimente mit kolloidalen Lösungen mit Anregung bei 405 nm, die ohne Mikroskop in Glasküvetten in 90°-Geometrie durchgeführt wurden. Für alle Experimente mit immobilisierten Nanopartikeln und Nanopartikeln in Zwiebelgewebe wurde ein 60x Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur (NA) von 1,2 verwendet. Das gleiche Objektiv wurde für die Messungen der SERS- und Raman-Spektren von Nanopartikel- und Analytlösungen mit Anregung bei 514 nm, 785 nm und auch bei 532 nm, wenn keine parallelen Hyper-Raman-Experimente erfolgten, verwendet. Für ein- und zweiphotonenangeregte Raman-Experimente von Lösungen bei einer Wellenlänge von 1064 nm und direkt parallel dazu erfolgende SERS-Experimente bei 532 nm wurde ein 10x Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,3 verwendet. Feste Proben wurden ebenfalls mit Hilfe von 10x Objektiven mit numerischen Aperturen von 0,3 bzw. 0,25 untersucht.

Für die SEHRS-Experimente ergeben sich daraus in Abhängigkeit vom verwendeten Objektiv unter Annahme eines elliptischen Fokusvolumens aus den nach Gl. 3.1^[6] und Gl. 3.2^[6] berechneten lateralen und axialen Auflösungen, $r_{lateral}$ und r_{axial} , Fokusvolumina von $0,3 \mu\text{m}^3$ (60x Objektiv) bzw. $54 \mu\text{m}^3$ (10x Objektiv). Dabei sind λ_0 die Anregungswellenlänge (für SEHRS: 1064 nm) und n der Brechungsindex des Immersi-

onsmediums, also von Wasser bzw. Luft.

$$r_{lateral} = 2 \cdot \sqrt{\ln(2)} \cdot \frac{0.325\lambda_0}{\sqrt{2} \cdot \text{NA}^{0.91}} \quad (3.1)$$

$$r_{axial} = \frac{0.532\lambda_0}{\sqrt{2}} \cdot \frac{1}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}} \quad (3.2)$$

Für die Fokusvolumina im SERS-Experiment kann eine zylindrische Form angenommen, die laterale Auflösung nach dem Abbeschen Beugungskriterium (Gl. 3.3) und die axiale Auflösung anhand der Halbwertsbreite der axialen Intensitätsverteilung (Gl. 3.4)^[159] berechnet werden.

$$r_{lateral} = \frac{0.61\lambda_0}{\text{NA}} \quad (3.3)$$

$$r_{axial} = \frac{0.88\lambda_0}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}} \quad (3.4)$$

Die Fokusvolumina für die SERS-Experimente liegen zwischen $0,3 \mu\text{m}^3$ (für die Anregung bei 532 nm unter Verwendung des Objektivs mit $\text{NA} = 1,2$) und $598 \mu\text{m}^3$ (für die Anregung bei 1064 nm unter Verwendung des Objektivs mit $\text{NA} = 0,3$). Sie sind also bei Betrachtung der identischen Anregungsbedingungen um einen Faktor von ca. 10 größer als die Fokusvolumina im SEHRS-Experiment.

Rayleigh-Streuung wurde mit Hilfe von Notch- bzw. Langpassfiltern entfernt. Das Raman-Streulicht wurde auf einen Spalt mit einer Breite von $100 \mu\text{m}$ fokussiert und an verschiedenen Gittern gebeugt. Die Detektion erfolgte für die einphotonenangeregten Raman- und SERS-Spektren bei 1064 nm mit einem stickstoffgekühlten InGaAs-Zeilendetektor (HORIBA Jobin-Yvon GmbH), für alle anderen Experimente mit stickstoffgekühlten CCD-Detektoren (HORIBA Jobin-Yvon GmbH).

Für die Experimente mit Anregung bei 514 nm wurde ein an ein Mikroskop gekoppeltes LabRam HR800 (HORIBA Jobin-Yvon GmbH) verwendet, da dieser Aufbau eine Untersuchung des niederfrequenten Spektralbereichs zwischen 200 und 250 cm^{-1} ermöglicht. Die Anregungswellenlänge von 514 nm wurde gewählt um Vergleichbarkeit mit den anderen, bei 532 nm angeregten, Spektren zu gewährleisten.

Die spektrale Auflösung über den gesamten Spektralbereich betrug $2\text{-}3 \text{ cm}^{-1}$ für die einphotonenangeregten SERS- und Raman-Spektren bei 1064 nm , $6\text{-}8 \text{ cm}^{-1}$ für

die bei 532 nm angeregten SERS- und Raman-Spektren von Lösungen und für die Hyper-Raman- und SEHRS-Spektren, 9-13 cm⁻¹ für die bei 532 nm angeregten Raman-Spektren von festen Carotinproben, 11-15 cm⁻¹ für die bei 514 nm angeregten SERS-Spektren, 5-8 cm⁻¹ für die bei 785 nm angeregten SERS- und Raman-Spektren und 10-15 cm⁻¹ für die bei 405 nm angeregten SERS-Spektren.

3.5 Probenpräparation für die SEHRS- und SERS-Experimente

pH-abhängige Untersuchungen von pMBA Für SEHRS- und SERS-Experimente mit pMBA wurden 20 µL der jeweiligen kolloidalen Silbernanopartikellösung mit 2 µL einer NaCl-Lösung (1 mol L⁻¹) und 2 µL einer 10⁻⁴ mol L⁻¹ wässrigen Lösung von pMBA gemischt. Anschließend wurden 200 µL der jeweiligen pH-Pufferlösung zugegeben.

Untersuchungen der Carotinoide Für alle SEHRS-, SERRS- und SERS-Experimente mit Carotinoiden wurden Silbernanopartikel verwendet, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurden. Für SEHRS-Experimente mit Carotinoiden und quasisimultane SERRS-Experimente mit Anregung bei 532 nm wurden jeweils 20 µL der kolloidalen Silbernanopartikellösung mit 2 µL einer MgSO₄-Lösung (1 mol L⁻¹) und 2 µL einer Lösung des entsprechenden Carotins (3 · 10⁻⁵ mol L⁻¹ in Ethanol) gemischt. Anschließend wurde die gesamte Mischung mit 200 µL einer Lösung von 10 % (v/v) Ethanol in Wasser verdünnt. Für alle anderen SERRS-Experimente mit Anregung bei 532 nm bzw. 514 nm wurden die Mischungen, ohne den abschließenden Verdünnungsschritt, ebenso hergestellt wie für die SEHRS-Experimente, wobei unterschiedliche Konzentrationen von MgSO₄- bzw. NaCl-Lösungen und Carotinlösungen verwendet wurden um die entsprechenden Endkonzentrationen zu erzielen, die in Kapitel 5 bei den jeweiligen Spektren angegeben sind. Für die SERS-Experimente mit Anregung bei 1064 nm wurden 200 µL der kolloidalen Silbernanopartikellösung mit 20 µL einer MgSO₄-Lösung (0,1 mol L⁻¹) und 20 µL der Carotinlösung (3 · 10⁻⁵ mol L⁻¹) in Ethanol gemischt.

SEHRS-Spektren von Adenin und Cytosin Für SEHRS-Experimente mit Adenin und Cytosin wurden Silbernanopartikel, die durch Reduktion mit Citrat herge-

stellt wurden, verwendet. 20 μL der kolloidalen Silbernanopartikellösung wurden mit 2 μL einer MgSO_4 -Lösung (1 mol L^{-1}) und 2 μL einer Lösung von Adenin oder Cytosin ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) gemischt und anschließend die gesamte Mischung mit 200 μL Wasser verdünnt.

SERS-Spektren von *p*ATP und Adenin mit Anregung bei 405 nm Für die SERS-Experimente mit Anregung bei 405 nm, die in Küvetten durchgeführt wurden, wurden die kolloidalen Silbernanopartikellösungen in den in Abschnitt 7.4 angegebenen Volumenverhältnissen mit Wasser verdünnt und anschließend 600 μL der verdünnten Silberpartikellösung mit 60 μL der wässrigen Analytlösung gemischt. Wenn in Gegenwart von NaCl gemessen wurde, wurden vor der Zugabe der Analytlösung 600 μL der NaCl-Lösung zugegeben. Alle in Abschnitt 7.4 angegebenen NaCl- und Analytkonzentrationen sind Endkonzentrationen nach der Mischung aller Probenbestandteile.

Experimente mit immobilisierten Silbernanopartikeln und Nanopartikeln in Zwiebelgewebe Für SEHRS- und SERS-Untersuchungen der immobilisierten Silbernanopartikel und der Nanopartikel in Zwiebelgewebe wurden Tropfen der entsprechenden wässrigen Analytlösungen auf der Oberfläche platziert, sodass der Anregungslaser mit einem Wasserimmersionsobjektiv direkt auf die Oberfläche fokussiert werden konnte. Auf immobilisierte Nanopartikel, auf die vorab Analyten strukturiert aufgebracht worden waren, wurde anstelle der Analytlösung für die Messung ein Wassertropfen aufgebracht.

3.6 Auswertung der Raman- und Hyper-Raman-Spektren

Frequenzkalibrierung Vor der Auswertung der Spektren wurde grundsätzlich eine Frequenzkalibrierung anhand von jeweils sechs, über den gesamten Spektralbereich verteilten, Banden eines Raman-Spektrums von 4-Acetamidophenol oder Toluol bzw. einem Gemisch aus Toluol und Acetonitril durchgeführt. Eine Ausnahme bilden die SERS-Spektren, die bei 514 nm angeregt wurden; für diese wurde nur eine Versatzkorrektur anhand der Raman-Bande von Silicium bei 520 cm^{-1} durchgeführt.

Entfernung von Spikes Wenn in einem Datensatz nur in einzelnen Spektren Spikes vorkamen, wurden diese manuell gesucht und entfernt. Die für die SEHRS-Spektren oftmals verwendeten deutlich längeren Integrationszeiten führen dazu, dass in diesen Datensätzen deutlich mehr Spikes auftreten. Daher wurde dort zunächst ein automatisierter Algorithmus verwendet, der den Großteil der Spikes anhand der punktuellen Abweichung vom Median der ersten Ableitung des jeweiligen Spektrums erkennt. Anschließend erfolgte auch in diesen Spektren eine manuelle Nachkorrektur der übrigen Spikes. Die Intensitätswerte der Datenpunkte, die als Spikes identifiziert wurden, wurden in allen Fällen durch Interpolation ersetzt.

Bestimmung von Bandenintensitäten Für alle quantitativen Auswertungen der SEHRS- und SERS-Spektren (Bestimmung von Bandenverhältnissen für univariate Unterscheidungen verschiedener Analyten und Bestimmung von Verstärkungsfaktoren) wurden die Intensitäten einzelner Banden als Messgrößen benötigt. Die Bandenintensitäten wurden aus den Spektren ermittelt, indem das lokale Maximum in einem definierten Bereich rund um die jeweilige Bande bestimmt wurde und die Intensität des Untergrundes vom Maximalwert subtrahiert wurde. Zur Bestimmung der Untergrundintensität wurde eine Position in den Spektren verwendet, die möglichst nah an der jeweiligen Bande liegt und an der keine andere Bande auftritt. Die Bandenpositionen und zugehörigen Untergrundpositionen sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Bestimmung von Verstärkungsfaktoren Verstärkungsfaktoren EF wurden aus dem Verhältnis der Intensität einer definierten Bande anhand von Gleichung 3.5 abgeschätzt.

$$EF = \frac{I_{SERS} \cdot N_{RS}}{I_{RS} \cdot N_{SERS}} \quad (3.5)$$

Dabei sind I_{SERS} und I_{RS} die basislinienkorrigierten Intensitäten der jeweiligen Bande im SERS- bzw. Raman-Spektrum und N_{SERS} bzw. N_{RS} die Anzahlen der jeweils zum Signal beitragenden Moleküle. Für die Bestimmung der Verstärkungsfaktoren in den Experimenten mit Carotinen in kolloidalen Nanopartikellösungen wurden anstelle der Molekülanzahlen die Konzentrationen der Carotine verwendet, da das Fokusvolumen im SERS- und im Raman-Experiment identisch war, davon ausgegangen werden konnte, dass die Moleküle und Nanopartikel im gesamten Fokusvolumen gleichmäßig verteilt waren und weil das Verhältnis von Molekülanzahl zu verfügbarer Nanoparti-

Tabelle 3.2: Bandenpositionen, Bereiche in denen nach dem Maximum der Bande gesucht wurde, und Positionen, an denen jeweils die Intensität des Untergrunds bestimmt wurde, die bei den verschiedenen Analyten für die Bestimmung von Bandenverhältnissen und Verstärkungsfaktoren verwendet wurden. Alle Werte sind in cm^{-1} angegeben.

| Analyt | Bandenposition | Bereich | Untergrundposition |
|------------|----------------|-----------|---------------------------|
| Adenin | 735 | 725-740 | 765 |
| Cytosin | 798 | 785-805 | 765 |
| Carotin | 1520 | 1505-1545 | 1560 |
| Carotin | 1155 | 1145-1165 | 1230 |
| pMBA | 363 | 340-380 | 480 |
| pMBA | 523 | 500-550 | 480 |
| pMBA | 1178 | 1170-1200 | 1115 |
| pMBA | 1365 | 1330-1400 | 1200 (SEHRS), 1460 (SERS) |
| pMBA | 1685 | 1670-1720 | 1640 (SEHRS), 1760 (SERS) |
| CV | 1175 | 1165-1195 | 1100 |
| CV bzw. MG | 1444 | 1430-1455 | 1460 |
| CV bzw. MG | 1479 | 1465-1485 | 1460 |

keloberfläche im SERS-Experiment die Annahme rechtfertigt, dass sich auf den Nanopartikeln maximal eine Monolage von Molekülen befand. Bei Verwendung der immobilisierten Nanopartikel hingegen tragen nur diejenigen Moleküle zum SERS-Signal bei, die sich direkt auf der Oberfläche befinden. Für die Berechnung dieser Anzahl wurde aufgrund der Elektronenmikroskopie-Aufnahmen der immobilisierten Nanopartikel (Abb. 6.17 a-b) angenommen, dass das für das SERS-Signal relevante Volumen der Lösung maximal eine Höhe von zwei Nanopartikellagen hat.

Multivariate Auswertung Hauptkomponentenanalyse und hierarchische Clusteranalyse, sowie die Datenvorbereitung wurden mit MATLAB (The Mathworks, Inc.) durchgeführt. Für die multivariaten Analysen wurden die ersten Ableitungen der Spektren verwendet, die unter Verwendung des Glättungsalgorithmus' von Savitzky und Golay^[160] berechnet wurde, wobei für die Glättung ein Polynom zweiten Grades mit fünf Stützstellen verwendet wurde. Vor der Berechnung der Ableitungen wurden die Spektren zunächst im gewünschten Spektralbereich interpoliert und vektornormiert.

Basislinienkorrektur Eine Basislinienkorrektur von kompletten Spektren wurde ausschließlich für die bei 1064 nm angeregten SERS-, SEHRS- und Hyper-Raman-Spektren der Carotine vorgenommen. Die Korrektur erfolgte mit einem Algorithmus von Zhang *et al.*^[161].

3.7 Weitere Charakterisierung der Nanostrukturen und Analyten

Extinktionsspektren wurden mit einem UV/Vis/NIR-Spektrophotometer (V-670, Jasco) in Transmission aufgenommen. Für Lösungen wurden Küvetten aus Quarzglas mit einer Weglänge von 1 cm verwendet. Die Glasträger mit immobilisierten Nanopartikeln wurden mit Hilfe eines speziellen Probenhalters vermessen.

Elektronenmikroskopie Transmissionselektronenmikroskopie-Bilder der Silbernanopartikel wurden mit einem Tecnai G² 20 S-TWIN (FEI) bzw. einem JEM 2200-FS (Jeol) Mikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV aufgenommen. Die kolloidalen Nanopartikellösungen wurden auf kohlenstoffbeschichtete Kupfergitter aufgebracht.

Rasterelektronenmikroskopie-Bilder der immobilisierten Silbernanopartikel wurden mit einem Hitachi SU8030 Mikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 3 kV aufgenommen. Zur Erhöhung der Leitfähigkeit wurden die Proben mit einem dünnen Kohlenstofffilm bedampft.

Abschätzung der Nanopartikelkonzentrationen Anhand der Elektronenmikroskopie-Aufnahmen wurden die mittleren Durchmesser der Nanopartikel bestimmt. Aus diesen wurde die Anzahl der Silberatome pro Nanopartikel berechnet, sodass unter der Annahme, dass alle in der Herstellung eingesetzten Silberionen zu Nanopartikeln umgesetzt wurden, die Konzentration der Nanopartikel berechnet werden konnte. Zur Vereinfachung der Berechnung und da nur eine grobe Abschätzung der Konzentration erfolgen sollte, wurden ausschließlich die annähernd sphärischen Nanopartikel berücksichtigt. Für die Silbernanopartikel, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurden, ist diese Bedingung für die meisten Partikel erfüllt, bei den durch Reduktion mit Citrat hergestellten Silbernanopartikeln liegen zu etwa 50 % auch Stäbchen mit sehr verschiedenen Seitenverhältnissen und andere Formen vor.

Dynamische Lichtstreuung (DLS) und zeta-Potentiale wurden bei einer Wellenlänge von 633 nm mit einem Zetasizer[®] Nano ZS (Malvern Instruments) gemessen. Die Messung fand im Rückstreumodus in einem Winkel von 173 ° statt. DLS-Messungen erfolgten in Halbmikroküvetten aus Polymethylmethacrylat. Die Proben wurden für 120 s bei einer Temperatur von 25 °C equilibriert. Anschließend wurden drei Messreihen durchgeführt, die jeweils aus zehn Messungen mit einer Messzeit von 20 s bestanden. zeta-Potential-Messungen erfolgten in speziellen Kapillarzellen aus Kunststoff. Es wurde ebenfalls für 120 s bei einer Temperatur von 25 °C equilibriert, bevor jeweils drei Messungen im Abstand von 30 s durchgeführt wurden.

Für DLS-Messungen der Silbernanopartikel mit verschiedenen Salzen wurden 100 µL einer kolloidalen Silbernanopartikellösung mit 10 µL einer NaCl- oder MgSO₄-Lösung (0,1 mol L⁻¹ oder 1 mol L⁻¹) und 1 mL Wasser gemischt. Für zeta-Potential-Messungen bei verschiedenen pH-Werten wurden 100 µL einer kolloidalen Silbernanopartikellösung mit 10 µL einer NaCl-Lösung (1 mol L⁻¹), 100 µL der entsprechenden pH-Pufferlösung und 900 µL Wasser gemischt.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) Zur Aufnahme von NMR-Spektren der Carotinoide wurden die Carotinoide in CDCl₃ gelöst. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem AVANCE II 500 (Bruker).

Kapitel 4

Analytische Anwendung von SEHRS und SERS am Beispiel eines pH-Sensors

Die Abhängigkeit der SERS-Spektren von *para*-Mercaptobenzoessäure (*p*MBA) vom pH-Wert ist bereits vielfältig untersucht worden^[22–27] und auch anhand von SEHRS-Spektren^[24] lassen sich mit Hilfe von *p*MBA als Sonde lokale pH-Werte bestimmen. Daher wurde ein pH-Sensor, bestehend aus *p*MBA und Silbernanopartikeln, hier als erstes Anwendungsbeispiel gewählt, um die unterschiedlichen Einflüsse auf die SERS-Spektren bei Ein- und Zweiphotonenanregung durch verschiedene Silbernanopartikel-sorten zu untersuchen.

4.1 Charakterisierung der Silbernanopartikel

Alle verwendeten Silbernanopartikel wurden durch chemische Reduktion von Silber(I)-Ionen in wässriger Lösung hergestellt. Die vier verschiedenen Sorten der Nanopartikel unterscheiden sich in der Art bzw. Menge der zur Herstellung verwendeten Reduktionsmittel und Stabilisatoren. Dadurch weisen die Nanopartikel unterschiedliche Größen und Formen auf (Abb. 4.1) und unterscheiden sich in ihren Oberflächenbeschaffenheiten (z. B. Ladung oder Kristallstruktur). Durch Reduktion mit Citrat entstehen, im Vergleich mit den anderen Methoden, relativ große Partikel, die neben annähernd sphärischen Formen auch andere Formen, vor allem Stäbchen, aufweisen (Abb. 4.1 a). Die Reduktion mit Hydroxylamin ergibt hauptsächlich sphärische Partikel mit einer schma-

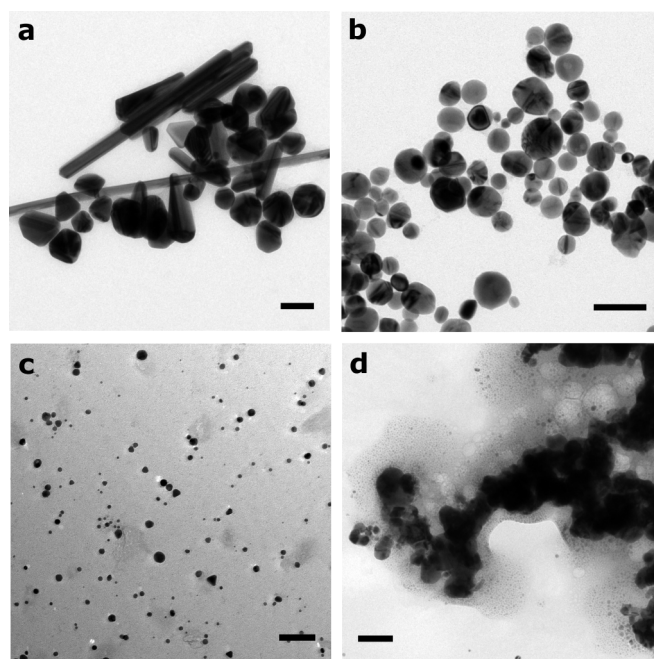


Abb. 4.1: Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen der in dieser Arbeit verwendeten Sorten von Silbernanopartikeln. Hergestellt durch (a) Reduktion und Stabilisierung mit Citrat, (b) Reduktion mit Hydroxylamin, (c) Reduktion mit Natriumborhydrid und Stabilisierung mit Citrat I, (d) Reduktion mit Natriumborhydrid und Stabilisierung mit Citrat II. Alle Skalen entsprechen einer Länge von 100 nm.

leren Größenverteilung (Abb. 4.1 b). Die beiden Methoden, bei denen Natriumborhydrid als Reduktionsmittel verwendet wurde, ergeben aufgrund des unterschiedlichen Verhältnisses von NaBH_4 zu Citrat sehr unterschiedliche Partikel: Bei Methode I entstehen Partikel, die deutlich kleiner sind als bei allen anderen Methoden (Abb. 4.1 c), bei Methode II entstehen große Agglomerate von Partikeln (Abb. 4.1 d).

Die unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften der vier Nanopartikelsorten führen zu unterschiedlichen plasmonischen Eigenschaften. Zusätzlich verursachen die elektrostatischen und strukturellen Unterschiede an den Partikeloberflächen Variationen in der Wechselwirkung der Partikel untereinander und mit den Analytmolekülen, was ebenfalls einen Einfluss auf die konkret im SEHRS- oder SERS-Experiment vorliegenden plasmonischen Eigenschaften haben kann. Diese Unterschiede lassen sich anhand eines Vergleichs der Extinktionsspektren der verschiedenen Nanoaggregate erkennen (Abb. 4.2 a). Für die Messung dieser Spektren wurden die kolloidalen Silbernanopartikellösungen mit Natriumchlorid-, *p*MBA- und pH-Pufferlösungen im gleichen Verhältnis wie für die weiter unten diskutierten SEHRS-Experimente gemischt. Man sieht, dass sich die Extinktionsmaxima der Nanoaggregate, vor allem aber die Breiten

4.2 pH-Abhängigkeit der SEHRS-Spektren von *para*-Mercaptobenzoessäure

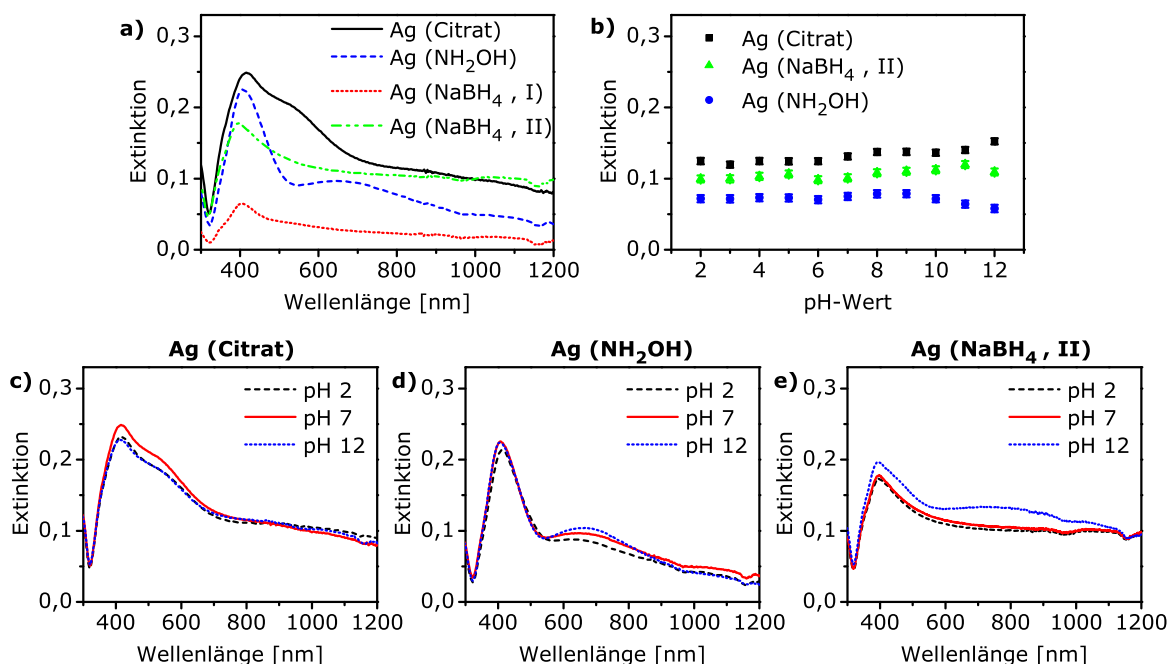


Abb. 4.2: Extinktionsspektren der Silbernanoaggregate mit *p*MBA so wie sie im SEHRS-Experiment eingesetzt wurden. (a) Spektren der verschiedenen Partikelsorten bei pH 7, (b) Extinktion bei 1064 nm der Silbernanoaggregate bei verschiedenen pH-Werten, (c-e) Spektren für jeweils eine Partikelsorte bei verschiedenen pH-Werten: (c) Reduktion mit Citrat, (d) Reduktion mit Hydroxylamin, (e) Reduktion mit NaBH₄ (Methode II).

der Plasmonenbanden und die Extinktion oberhalb von 800 nm für die verschiedenen Nanopartikelsorten unterscheiden. Der pH-Wert ändert jedoch die Extinktionsspektren, für jede Partikelsorte einzeln betrachtet, nur wenig (Abb. 4.2 c-e), sodass auch die Extinktion bei 1064 nm, der Anregungswellenlänge für die SEHRS-Experimente, stabil ist (Abb. 4.2 b). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Unterschiede zwischen den SEHRS- bzw. SERS-Spektren bei verschiedenen pH-Werten tatsächlich durch Protonierung bzw. Deprotonierung der Analytmoleküle oder eine geänderte Wechselwirkung der Moleküle mit der Silberoberfläche, nicht aber durch plasmonische Effekte, begründet sind. Das zeigt, dass die hier verwendeten Silbernanoartikel als plasmonische Substrate für pH-Messungen geeignet sind.

4.2 pH-Abhängigkeit der SEHRS-Spektren von *para*-Mercaptobenzoessäure

Die SEHRS-Spektren von *p*MBA mit unterschiedlichen Silbernanopartikelsorten sind untereinander sehr ähnlich: Sie weisen im wesentlichen die gleichen Banden auf, die sich nur in wenigen relativen Intensitäten unterscheiden (Abb. 4.3 a-c). Die kleinen Unterschiede, die vor allem bei niedrigen pH-Werten erkennbar sind, lassen sich durch eine

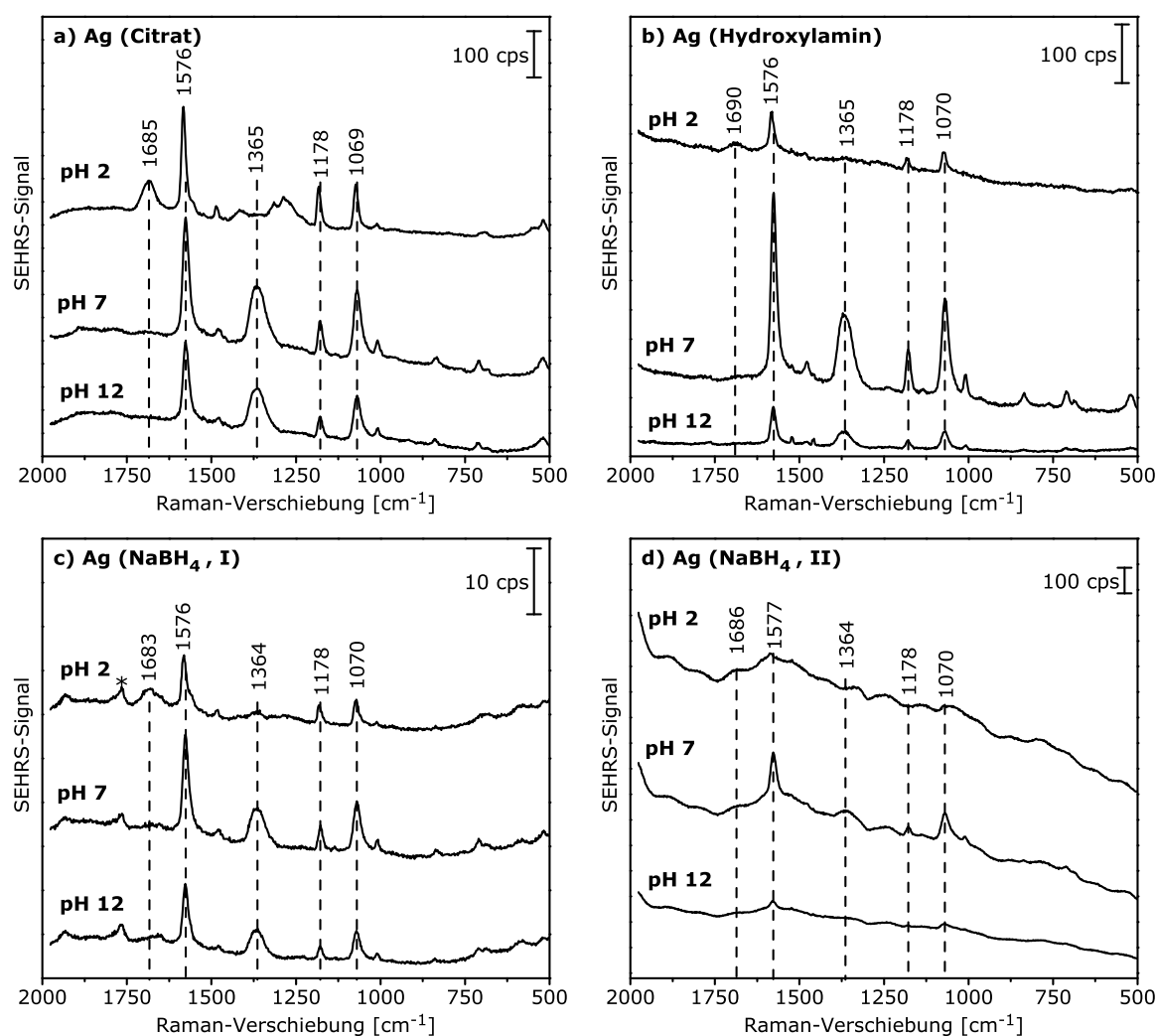


Abb. 4.3: SEHRS-Spektren von *p*MBA ($9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) bei den pH-Werten 2, 7 und 12 mit Silbernanopartikeln, die hergestellt wurden durch Reduktion mit (a) Citrat, (b) Hydroxylamin, (c) NaBH_4 , Methode I, (d) NaBH_4 , Methode II. Anregungswellenlänge: 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{28} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: (a, b) 2 s, (c) 15 s, (d) 10 s. Die Spektren sind Mittelwerte aus jeweils 30 Spektren einer Probe.

4.2 pH-Abhängigkeit der SEHRS-Spektren von *para*-Mercaptobenzoessäure

unterschiedliche Wechselwirkung der *p*MBA-Moleküle mit den verschiedenen gearteten Silberoberflächen erklären. Eine Ausnahme bilden die Silbernanopartikel, die durch Reduktion mit Natriumborhydrid (Methode II) hergestellt wurden. In den SEHRS-Spektren dieser Partikel ist ein intensiver Untergrund zu beobachten (Abb. 4.3 d), der dazu führt, dass fast ausschließlich bei neutralem pH-Wert und auch dort nur wenige Banden von *p*MBA in den SEHRS-Spektren zu finden sind. Der Untergrund wird vermutlich durch Rayleigh-Streuung an den bei dieser Nanopartikelsorte vorhandenen sehr

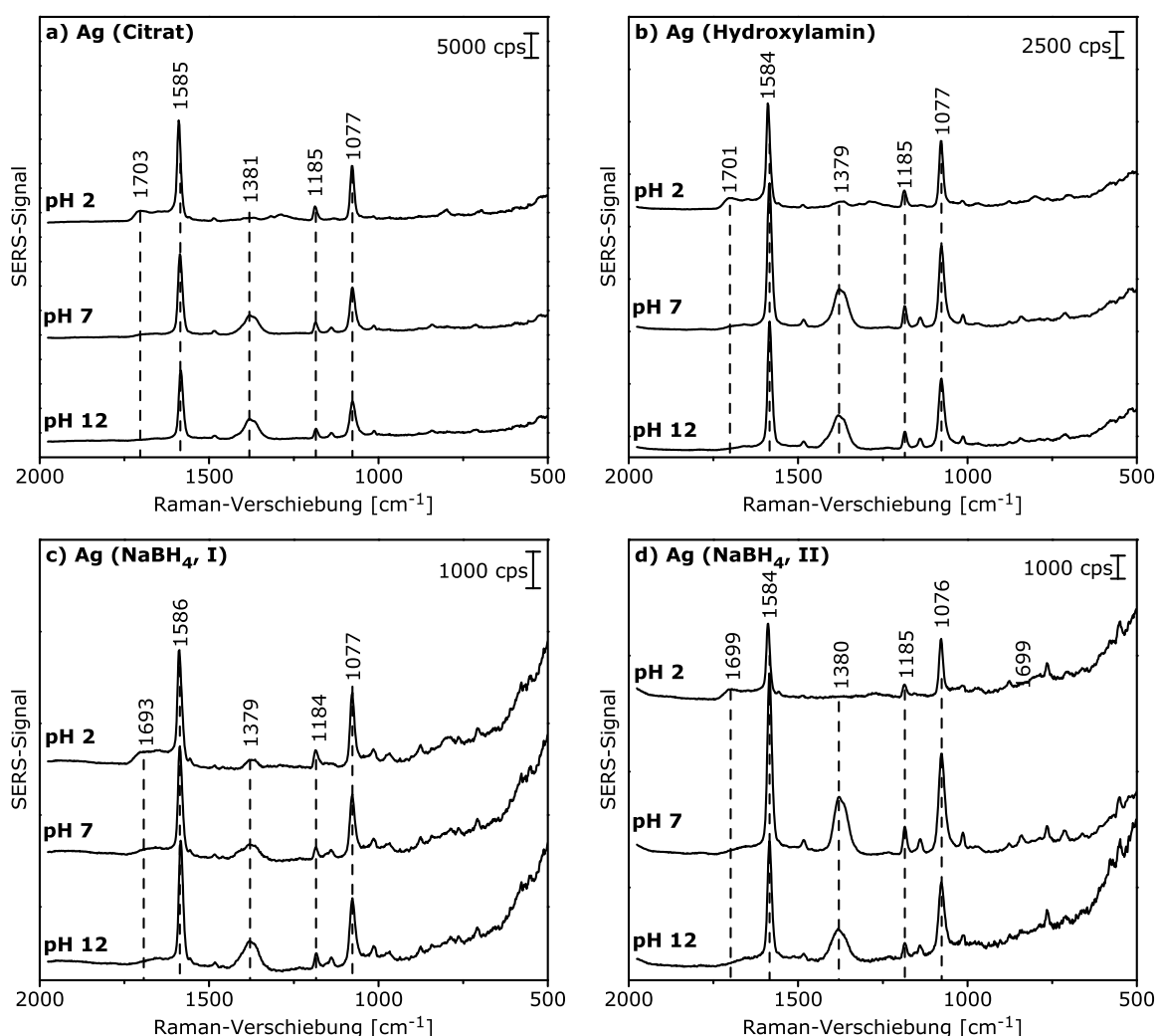


Abb. 4.4: SERS-Spektren von *p*MBA ($9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) bei den pH-Werten 2, 7 und 12 mit Silbernanopartikeln, die hergestellt wurden durch Reduktion mit (a) Citrat, (b) Hydroxylamin, (c) NaBH_4 , Methode I, (d) NaBH_4 , Methode II. Anregungswellenlänge: 532 nm, Photonenflussdichte: $7 \cdot 10^{23} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: (a, b, d) 1 s, (c) 2 s. Die Spektren sind Mittelwerte aus jeweils 30 Spektren einer Probe.

großen Partikelagglomeraten (Abb. 4.1) verursacht oder kann mit der Konzentration dieser Nanopartikel zusammenhängen, wie an einem anderen Beispiel in Abschnitt 7.2 gezeigt wird. Daher können diese Nanopartikel, trotz ihrer scheinbar geeigneten plasmonischen Eigenschaften (Abb. 4.2 a, e), für die pH-Detektion mittels SEHRS nicht verwendet werden. In den SERS-Spektren von *p*MBA mit dieser Nanopartikelsorte, die bei 532 nm angeregt wurden, besteht dieses Problem nicht (Abb. 4.4 d), sie sind im für *p*MBA relevanten Spektralbereich ähnlich wie die SERS-Spektren von *p*MBA mit den anderen Nanopartikelsorten (Abb. 4.4 a-c). Allerdings fällt auf, dass sowohl in den SEHRS-Spektren als auch in den SERS-Spektren von *p*MBA mit beiden durch Reduktion mit NaBH₄ hergestellten Nanopartikelsorten die absolute Signalintensität geringer ist (Abb. 4.3 c-d und Abb. 4.4 c-d) als mit den durch Reduktion mit Citrat oder Hydroxylamin hergestellten Nanopartikeln (Abb. 4.3 a-b und Abb. 4.4 a-b). Dies kann auf eine schwächere Wechselwirkung der *p*MBA-Moleküle mit den durch Reduktion mit NaBH₄ hergestellten Nanopartikeln, aber auch auf eine geringere plasmonische Verstärkung hindeuten. Im Folgenden werden aus diesen Gründen die durch Reduktion mit Citrat und Hydroxylamin hergestellten Silbernanopartikel verwendet.

Insgesamt unterscheiden sich die SEHRS-Spektren kaum von den bei 532 nm angeregten SERS-Spektren von *p*MBA und in beiden Fällen sind die Spektren mit den durch Reduktion mit Citrat hergestellten Silbernanopartikeln in Übereinstimmung mit Spektren, die für *p*MBA mit dieser Partikelsorte bereits berichtet wurden.^[24,25] Einige Banden in den SEHRS-Spektren sind allerdings gegenüber den SERS-Spektren um 5-15 cm⁻¹ verschoben. Dies wird in Abschnitt 4.4 unter zusätzlicher Berücksichtigung der bei 1064 nm angeregten SERS-Spektren diskutiert. Hier sollen zunächst die deutlichen pH-abhängigen Unterschiede, die für die potentielle Anwendung für die pH-Sensorik ausgenutzt werden können, beschrieben werden.

In basischer Lösung, wenn die *p*MBA-Moleküle deprotoniert sind, ist die COO⁻-Streckschwingungsbande bei 1365 cm⁻¹ in den SEHRS- und SERS-Spektren intensiver als in den Spektren der sauren Lösung (Abb. 4.3 und Abb. 4.4). Umgekehrt ist in saurer Lösung die C=O-Streckschwingungsbande der protonierten Carboxylgruppe bei 1685 cm⁻¹ intensiver. Um Einflüsse durch generelle Unterschiede der SEHRS- und SERS-Verstärkung bei den verschiedenen pH-Werten (siehe auch Kapitel 7) auf die pH-Wert-Bestimmung zu vermeiden, wurden bereits in anderen Arbeiten nicht die absoluten Intensitäten dieser Banden als Indikatoren für den pH-Wert verwendet, sondern deren Verhältnisse zu den Intensitäten der Banden der Aromatenschwingun-

4.2 pH-Abhängigkeit der SEHRS-Spektren von *para*-Mercaptobenzoessäure

gen bei 1069 cm^{-1} , 1178 cm^{-1} und 1576 cm^{-1} , die pH-unabhängig sind,^[24,27] oder das Verhältnis der beiden gegenläufig pH-abhängigen Banden untereinander.^[22]

Der Vergleich der Intensitäten der COO^- -Streckschwingungsbande und der C=O -Streckschwingungsbande in den SEHRS-Spektren, jeweils normiert auf die Intensität der C-H-Deformationsschwingung bei 1178 cm^{-1} , bei Verwendung der verschiedenen Silbernanopartikel zeigt, dass die durch Reduktion mit Citrat hergestellten Nanopartikel eine wesentlich empfindlichere pH-Wert-Bestimmung ermöglichen als die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Partikel (Abb. 4.5). Bei den durch Reduktion mit Citrat hergestellten Silberpartikeln sind die in Abb. 4.5 betrachteten pH-Werte im Bereich von 2 bis 8, zwischen denen jeweils etwa eine pH-Einheit liegt, relativ eindeutig unterscheidbar (Abb. 4.5 a, c). Bei dieser Partikelsorte ist die COO^- -

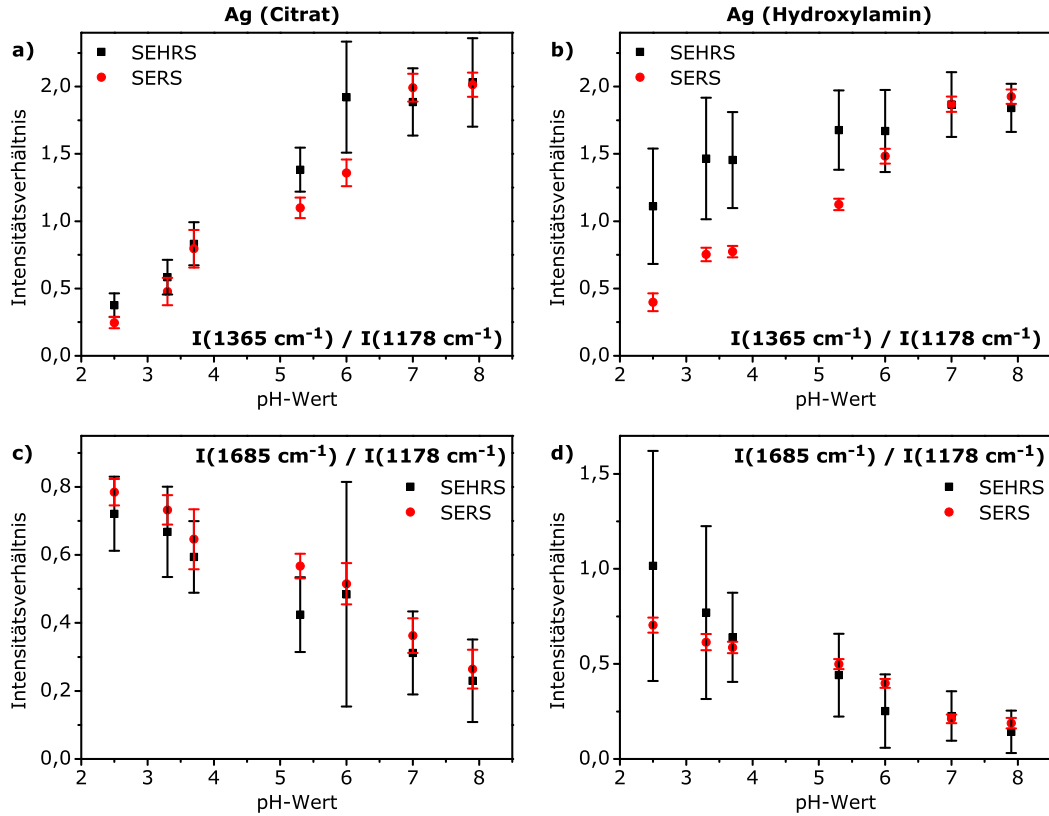


Abb. 4.5: Intensitätsverhältnisse der Banden bei (a-b) 1365 cm^{-1} und 1178 cm^{-1} bzw. bei (c-d) 1685 cm^{-1} und 1178 cm^{-1} in den SEHRS-Spektren bei Anregung mit 1064 nm (schwarz in a-d) und SERS-Spektren bei Anregung mit 532 nm (rot in a-d) von *p*MBA mit den Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat (a, c) bzw. Hydroxylamin (b, d) hergestellt wurden, im pH-Wert-Bereich 2-8. Die Intensitätsverhältnisse sind Mittelwerte aus jeweils 30 Spektren, die Fehlerbalken zeigen die zugehörigen Standardabweichungen.

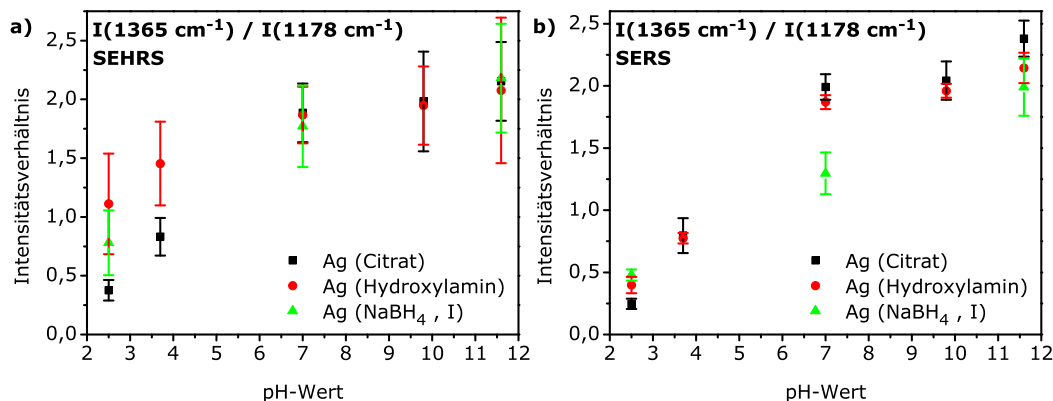


Abb. 4.6: Intensitätsverhältnisse der Banden bei 1365 cm^{-1} und 1178 cm^{-1} in den (a) SEHRS-Spektren (1064 nm) und (b) SERS-Spektren (532 nm) von *p*MBA für mehrere Nanopartikelsorten im pH-Wert-Bereich 2-12. Die Intensitätsverhältnisse sind Mittelwerte aus jeweils 30 Spektren, die Fehlerbalken zeigen die zugehörigen Standardabweichungen.

Bande am besten für die pH-Wert-Bestimmung geeignet, da für diese Bande nicht nur ein Trend für die einzelnen Messpunkte erkennbar ist, sondern die mittleren Intensitätsverhältnisse im pH-Wert-Bereich von 2 bis 6 zusätzlich außerhalb der Fehlertoleranzen des jeweils benachbarten Messpunktes liegen (Abb. 4.5 a), während die Verteilung der Intensitäten für die C=O-Bande breiter ist (Abb. 4.5 c). Bei den durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Silbernanopartikeln hingegen ist die sehr breite COO⁻-Streckschwingungsbande in den SEHRS-Spektren nicht für eine genaue pH-Wert-Bestimmung verwendbar (Abb. 4.5 b), während bei der C=O-Bande immerhin ein Trend zu beobachten ist (Abb. 4.5 d).

Die Intensitätsverhältnisse in den bei 532 nm angeregten SERS-Spektren erlauben mit beiden Nanopartikelsorten eine präzisere Unterscheidung von pH-Werten im sauren bis neutralen Bereich als die SEHRS-Spektren (Abb. 4.5). Dabei ist hervorzuheben, dass die Standardabweichungen der Intensitätsverhältnisse bei den durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Nanopartikeln noch etwas kleiner sind als bei den Citrat-Partikeln. Die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Partikel, mit denen anhand der SEHRS-Spektren kaum Unterscheidung der verschiedenen pH-Werte möglich ist, bieten also anhand der SERS-Spektren die präziseste Unterscheidung.

Da der pK_a -Wert von *p*MBA im sauren Bereich liegt, sind bei sehr hohen pH-Werten alle Carboxylgruppen deprotoniert, sodass oberhalb eines pH-Wertes von 8 kaum noch Änderungen der entsprechenden Banden in den SEHRS- und SERS-Spektren zu beobachten sind. Dennoch zeigt Abb. 4.6, dass sich der Trend der Intensitätsverhältnisse

in den SEHRS- und SERS-Spektren auch beim Übergang von neutraler zu extrem basischer Umgebung fortsetzt, allerdings mit schwächerer Ausprägung, sodass in diesem Bereich nur eine grobe Unterscheidung möglich ist. Im Hinblick auf potentielle biologische Anwendungen des pH-Sensors ist jedoch ohnehin der Bereich der sauren und neutralen pH-Werte interessanter: Abweichungen vom physiologischen, neutralen pH-Wert hin zu niedrigeren pH-Werten spielen z. B. bei endocytotischen und exocytotischen Transportwegen und beim Wachstum von Krebszellen eine Rolle.^[162–164] Dies ist genau der pH-Wert-Bereich, in dem die Detektion basierend auf den SERS- und SEHRS-Spektren von *p*MBA besonders empfindlich ist.

4.3 SERS-Spektren von *para*-Mercaptobenzoessäure mit Anregung bei 1064 nm

Mit den Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat bzw. Hydroxylamin hergestellt wurden, konnten SERS-Spektren von *p*MBA auch mit Anregung bei 1064 nm in guter Qualität erhalten werden (Abb. 4.7). Mit den durch Reduktion mit NaBH₄ nach Methode I hergestellten Nanopartikeln wurden bei dieser Anregungswellenlänge nur sehr schwache Signale von *p*MBA erhalten, die für eine Unterscheidung der pH-Werte nicht ausreichen (hier nicht gezeigt). Die Partikel, die nach der NaBH₄-Reduktionsmethode II hergestellt wurden, wurden deshalb und weil mit ihnen schon in den SEHRS-Spektren bei derselben Anregungswellenlänge ein intensiver Streuuntergrund auftrat, hier nicht untersucht.

Die Moden der Carboxyl- bzw. Carboxylatgruppe bei 1685 cm⁻¹ bzw. 1365 cm⁻¹, deren Intensität in den SEHRS-Spektren und in den bei 532 nm angeregten SERS-Spektren zur Unterscheidung verschiedener pH-Werte dienen kann (siehe Abschnitt 4.2), sind in den bei 1064 nm angeregten SERS-Spektren nur sehr schwach, es sind hauptsächlich die Schwingungen des Phenylrings zu beobachten (Abb. 4.7). Allerdings gibt es eine Bande mit vom pH-Wert abhängiger Intensität bei 363 cm⁻¹, die insbesondere bei hohen pH-Werten sehr intensiv ist (Abb. 4.7). Diese Bande wurde bisher wenig untersucht, da sie oft außerhalb des messbaren Spektralbereichs liegt, wurde aber bereits früher für deprotonierte *p*MBA beobachtet.^[165] Unter Zuhilfenahme der SERS-Spektren von *ortho*-Mercaptobenzoessäure^[166] und Naphthalenthio^[71] kann sie einer C-S-Streckschwingung in Kombination mit einer Phenyldeformationsschwingung zugeordnet werden. Das Intensitätsverhältnis zwischen dieser Bande und der Phenyl-

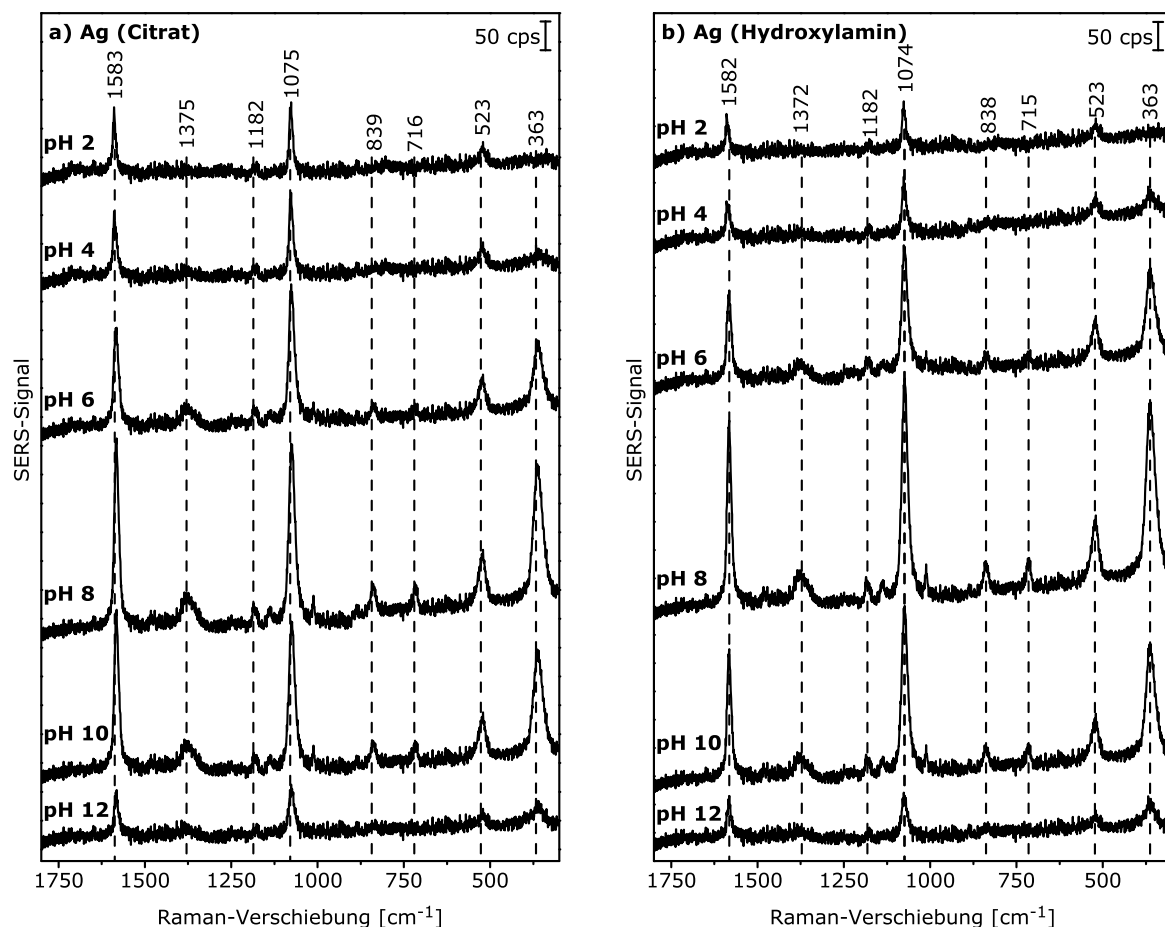


Abb. 4.7: SERS-Spektren von $p\text{MBA}$ ($9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit (a) Citrat bzw. (b) Hydroxylamin erhalten wurden, bei verschiedenen pH-Werten. Anregungswellenlänge: 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $3 \cdot 10^{28} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 10 s. Die Spektren sind Mittelwerte von jeweils 30 Spektren einer Probe.

deformationsbande bei 523 cm^{-1} , ist eine sehr empfindliche Messgröße für pH-Werte zwischen 2 und 7 (Abb. 4.8). Die Unterscheidung der pH-Werte ist hierbei ähnlich gut wie mit den im Sichtbaren angeregten SERS-Spektren und damit besser als anhand der ebenfalls bei 1064 nm angeregten SEHRS-Spektren (vgl. Abb. 4.5). Dadurch ergibt sich mit SERS-Spektren, die bei 1064 nm angeregt werden, eine zusätzliche Möglichkeit für die Bestimmung lokaler pH-Werte, die aufgrund der nahinfraroten Anregungswellenlänge für Anwendungen in biologischen Proben besser geeignet ist als die bisher untersuchten kürzeren Anregungswellenlängen für SERS.

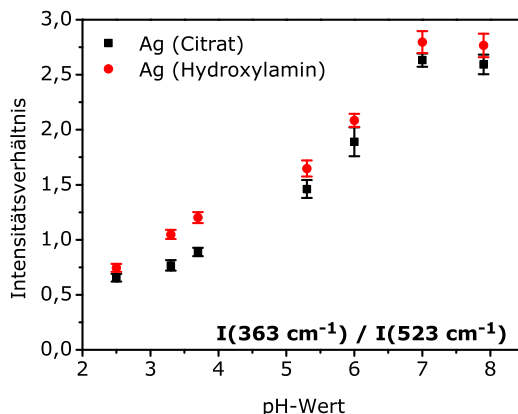


Abb. 4.8: Intensitätsverhältnisse der Banden bei 363 cm^{-1} und 523 cm^{-1} in den SERS-Spektren (1064 nm) von *p*MBA bei den pH-Werten 2-8. Die Intensitätsverhältnisse sind Mittelwerte aus jeweils 30 Spektren, die Fehlerbalken zeigen die zugehörigen Standardabweichungen.

4.4 Kombination der verschiedenen Spektren zur Charakterisierung des pH-Sensors

Wie in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt wurde, ermöglichen SEHRS-Spektren von *p*MBA in ähnlicher Weise wie die SERS-Spektren eine Unterscheidung verschiedener pH-Werte. Die Empfindlichkeit des pH-Sensors ist dabei allerdings im Fall von SEHRS etwas geringer (Abb. 4.5). Im Folgenden soll gezeigt werden, dass die SEHRS-Spektren dahingegen einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung des auf *p*MBA und Silbernanopartikeln basierenden pH-Sensors leisten. So können insbesondere Änderungen der Orientierung der *p*MBA-Moleküle auf der Silberoberfläche und die entsprechend stattfindende Wechselwirkung anhand der SEHRS-Spektren verfolgt werden.

Auf den ersten Blick sind die SEHRS- und SERS-Spektren von *p*MBA sehr ähnlich, da das Muster der relativen Bandenintensitäten sich kaum unterscheidet (vgl. Abb. 4.3 und Abb. 4.4 bzw. Abb. 4.7). Allerdings treten einzelne Banden in den SEHRS-Spektren bei um $5\text{--}15\text{ cm}^{-1}$ kleineren Raman-Verschiebungen auf und die SEHRS-Spektren enthalten einzelne zusätzliche Banden und Schultern, deren Anwesenheit zum Teil vom pH-Wert abhängig ist (Für eine Übersicht der Bandenpositionen bei den verschiedenen Anregungsmethoden und bei verschiedenen pH-Werten siehe Tabelle 4.1.). Das deutet darauf hin, dass in den SEHRS- und SERS-Spektren unterschiedliche Moden beobachtet werden. Die Ursache dafür können unterschiedliche Adsorptionsgeometrien (im wesentlichen entweder parallel zur Oberfläche oder aufrecht gewinkelt) und

Tabelle 4.1: Bandenpositionen in cm^{-1} und Zuordnungen^[25,71,103,166–170] für die SERS- und SEHRS-Spektren von *p*MBA mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden.

| SEHRS (1064 nm) | | | SERS (1064 nm) | | | SERS (532 nm) | | | Zuordnung ^a |
|-----------------|------|-------|----------------|------|-------|---------------|------|-------|--------------------------------------|
| pH 2 | pH 7 | pH 12 | pH 2 | pH 7 | pH 12 | pH 2 | pH 7 | pH 12 | |
| | | | | 363 | 361 | | | | δ (Phenyl), ν (C-S) |
| 519 | 520 | 520 | 523 | 523 | 522 | | | | i.p. δ (Ring) |
| | 684 | 684 | | | | | | | o.o.p. δ (C-H) |
| 695 | | | | | | 697 | | | o.o.p. δ (C-H, CCC) |
| | 710 | 712 | | 716 | | | 714 | 714 | o.o.p. δ (CCC) |
| | | | | | | 800 | | | o.o.p. δ (C-COOH) |
| | 836 | 840 | | 839 | | | 842 | 842 | δ (COO ⁻) |
| 1011 | 1009 | 1009 | | 1012 | | | 1013 | 1013 | δ (Ring) |
| 1073 | 1069 | 1070 | 1077 | 1075 | 1075 | 1078 | 1077 | 1077 | Ringatemschwingung |
| | | | | 1138 | | | 1139 | 1139 | ν (C-COO ⁻) |
| 1182 | 1178 | 1179 | 1182 | 1182 | 1179 | 1187 | 1185 | 1184 | i.p. δ (C-H) |
| | 1365 | 1366 | | | | | 1368 | 1367 | ν (C-COO ⁻ , geb.) |
| | | | | 1375 | | 1381 | 1381 | 1381 | ν (C-COO ⁻ , n. geb.) |
| 1485 | 1479 | 1478 | | | | 1486 | 1485 | 1484 | i.p. δ (C-H) |
| 1583 | 1576 | 1576 | 1589 | 1583 | 1583 | 1590 | 1585 | 1583 | ν (Ring) |
| 1685 | | | | | | 1703 | | | ν (C=O in COOH) |

^a ν Streckschwingung, δ Deformationsschwingung, o.o.p. Schwingung aus der Ebene des Phenylrings heraus, i.p. Schwingung in der Ebene, geb. gebunden an Oberfläche, n. geb. nicht an Oberfläche gebunden.

chemische Wechselwirkungen der Moleküle an der Silberoberfläche sein, von denen einige ausschließlich in den SEHRS-Spektren, nicht aber in den SERS-Spektren beobachtbar sind. Hierbei kommt, neben den unterschiedlichen Symmetrierauswahlregeln von ein- und zweiphotonenangeregter Raman-Streuung, zum Tragen, dass SEHRS eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der Oberflächenladung und der chemischen Umgebung der Nanostrukturen hat als SERS.^[11]

Abb. 4.9 zeigt die Ringstreckschwingungsbande bei ca. 1580 cm^{-1} für die verschiedenen Anregungsbedingungen und unterschiedliche pH-Werte. In den SEHRS-Spektren wird diese Bande mit zunehmendem pH-Wert zuerst breiter und verschiebt sich, bis schließlich in sehr basischer Lösung eine Schulter bei kleinerer Raman-Verschiebung zu beobachten ist (Abb. 4.9 a). Die zusätzliche Schulter kann der nicht-totalsymmetrischen Streckschwingung zugeordnet werden, während die höherfrequente, intensivere Bande

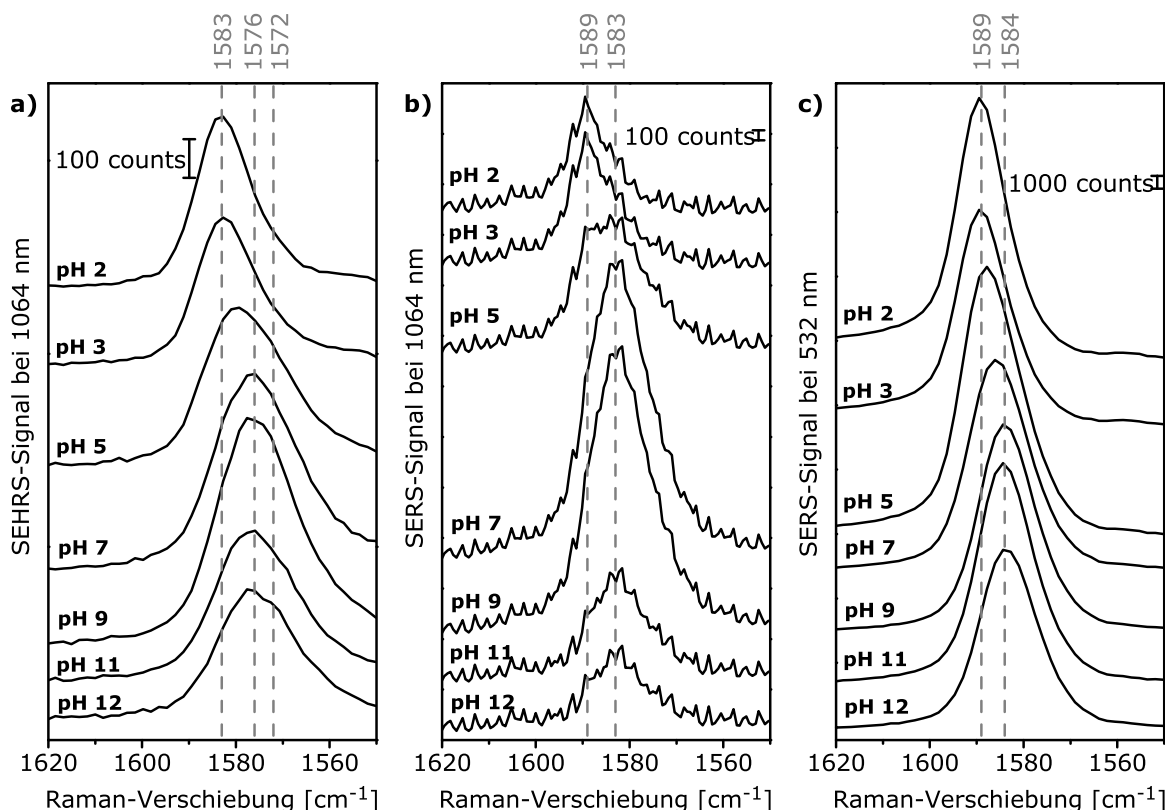


Abb. 4.9: Ausschnitte der (a) SEHRS-Spektren und (b, c) SERS-Spektren von *p*MBA mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden. Anregungswellenlängen: (a, b) 1064 nm, (c) 532 nm. Übrige experimentelle Parameter wie in Abb. 4.3 a, 4.7 a und 4.4 a.

der totalsymmetrischen Streckschwingung zugeordnet wird.^[170] Die nicht-totalsymmetrische Mode wurde in SERS-Spektren bisher dann beobachtet, wenn ein größerer Ladungstransfer zwischen den Phenylringen der *p*MBA-Moleküle und der Silberoberfläche stattfindet.^[168,170] Dieser wird durch eine Veränderung des π -Elektronensystems aufgrund von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Carboxylatgruppe mit den Wasserstoffatomen des Phenylrings^[168] oder mit Fremdmolekülen^[170] ermöglicht. Das Auftreten dieser Bande in den SEHRS-Spektren bei hohen pH-Werten deutet darauf hin, dass in basischer Lösung mehr *p*MBA-Moleküle parallel zur Silberoberfläche angeordnet sind. Denn in dieser Orientierung, bei der die Phenylringe und Carboxylatgruppen benachbarter *p*MBA-Moleküle in einer Ebene liegen, ist die Bildung von intermolekularen Wasserstoffbrücken begünstigt. Zusätzlich kann ein parallel zur Oberfläche liegender Phenylring auch an sich eine stärkere Wechselwirkung mit dem Silber eingehen.^[171] Im Prinzip wird dies auch durch die Verschiebung der Ringstreckschwingungsbande zu kleinerer Raman-Verschiebung in den SERS-Spektren (Abb. 4.9 b-c) gezeigt,

jedoch weisen die SERS-Spektren für jeden pH-Wert nur eine Bande auf, während das SEHRS-Spektrum bei pH 12 (Abb. 4.9 a) belegt, dass bei diesem pH-Wert keine einheitliche Adsorbatspezies, sondern unterschiedliche Molekülorientierungen vorliegen.

Ein weiterer Hinweis auf einen mit steigendem pH-Wert zunehmenden Anteil an parallel zur Silberoberfläche orientierten *p*MBA-Molekülen ist in der Carboxylatstreckschwingungsbande zu finden. Eine Verschiebung der Carboxylatstreckschwingung zu kleineren Raman-Verschiebungen deutet auf eine Wechselwirkung der Carboxylatgruppe mit der Metalloberfläche hin,^[25,169] die nur bei paralleler Anordnung der Moleküle möglich ist. In den bei 532 nm angeregten SERS-Spektren befindet sich diese Bande bei allen pH-Werten bei 1381 cm^{-1} , wobei bei hohen pH-Werten eine Schulter bei 1368 cm^{-1} hinzukommt (Abb. 4.4 a und Tabelle 4.1). In den SEHRS-Spektren sieht man die Carboxylatstreckschwingung ausschließlich bei hohen pH-Werten und dann nur bei 1365 cm^{-1} (Abb. 4.3 a und Tabelle 4.1), also dort, wo in den SERS-Spektren die Schulter auftritt. Zudem ist die Bande in den SEHRS-Spektren im Verhältnis zu den Ringschwingungen bei 1069 cm^{-1} und 1576 cm^{-1} intensiver als in den SERS-Spektren. Anhand der Carboxylatbande lassen sich demnach in den SERS-Spektren hauptsächlich die aufrecht adsorbierten Moleküle beobachten, während in den SEHRS-Spektren ausschließlich die parallel zur Oberfläche angeordneten Moleküle nachgewiesen werden.

Die Banden der Phenyldeformationsschwingungen außerhalb der Ringebene liefern in den SEHRS-Spektren deutlichere Hinweise auf die Orientierung der Moleküle an der Oberfläche als die SERS-Spektren: Die C-H- und CCC-Deformationsschwingungsbanden aus der Ebene des Phenylrings heraus,^[25,168,170] bei 684 cm^{-1} und 710 cm^{-1} , sind in den SEHRS-Spektren bei höheren pH-Werten intensiver und können somit eindeutig aufgelöst werden, während sie in saurer Lösung schwächer sind und zu einer gemeinsamen breiten Bande bei 695 cm^{-1} überlagern (Abb. 4.10 a). Dies lässt sich mit den Oberflächenauswahlregeln, nach denen Schwingungen mit Polarisationsänderungen orthogonal zur Metalloberfläche mehr verstärkt werden,^[9] ebenso wie die oben genannten Beobachtungen auf mehr flach angeordnete Moleküle bei hohen und mehr gewinkelt angeordnete Moleküle bei niedrigen pH-Werten zurückführen. In den SERS-Spektren ist die C-H-Deformationsbande bei 684 cm^{-1} bei keinem der pH-Werte eindeutig aufgelöst, einen Hinweis auf ihre Anwesenheit gibt es dort nur bei niedrigen pH-Werten, bei denen bei 697 cm^{-1} eine ähnliche breite Bande auftritt (Abb. 4.10 b) wie in den SEHRS-Spektren. Die Zuordnung der SERS-Bande ist nur durch den Vergleich mit den SEHRS-Spektren bei hohen pH-Werten, wo beide Banden aufgelöst sind, möglich.

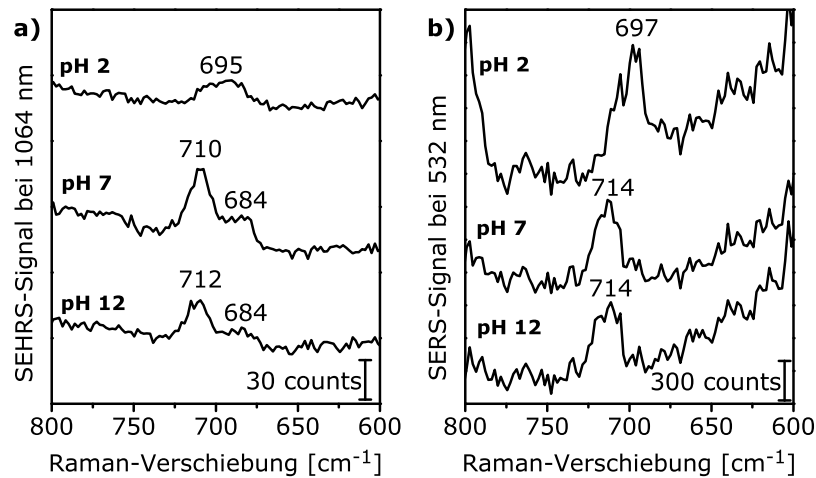


Abb. 4.10: Ausschnitte der (a) SEHRS-Spektren und (b) SERS-Spektren von *p*MBA mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden. Anregungswellenlängen: (a) 1064 nm, (b) 532 nm. Übrige experimentelle Parameter wie in Abb. 4.3 a und 4.4 a.

Die hier beschriebenen Beispiele zeigen, dass eine Kombination von Ein- und Zweiphotonenanregung eine umfassendere Charakterisierung von *p*MBA auf Silbernanopartikeloberflächen ermöglicht als SERS allein. Wie in Kapitel 5 gezeigt werden wird, ist dies auch auf andere Analyten anwendbar. Die SEHRS-Spektren sind insbesondere bei flacher Orientierung der *p*MBA-Moleküle auf der Oberfläche aussagekräftiger als SERS-Spektren. Die Auswahl der plasmonischen Nanostrukturen ist für SEHRS wesentlich kritischer als für SERS-Spektren, die mit sichtbarem Licht angeregt werden. In den Fällen, in denen SEHRS-Spektren von *p*MBA erhalten werden konnten, ist jedoch eine große Ähnlichkeit der Spektren, die mit verschiedenen Nanostrukturen erhalten wurden, beobachtbar (Abb. 4.3 a-c). Dies deutet darauf hin, dass die Orientierung der *p*MBA-Moleküle auf der Silberoberfläche in allen Fällen ähnlich und vor allem vom pH-Wert abhängig ist, nicht aber z. B. von der Oberflächenbedeckung: Geht man von einem Platzbedarf pro Molekül von $0,2 \text{ nm}^2$ aus,^[165] sind die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Silbernanopartikel bei den verwendeten Konzentrationen nur zu 50 % mit *p*MBA-Molekülen bedeckt, während die durch Reduktion mit Citrat bzw. NaBH_4 (Methode I) hergestellten Nanopartikel mit mehr als einer Monolage bedeckt sind. Daher könnte angenommen werden, dass die Moleküle auf den verschiedenen Nanopartikelsorten unterschiedliche Orientierungen einnehmen. Dies wird jedoch durch die große Ähnlichkeit der SEHRS-Spektren mit den verschiedenen Nanopartikelsorten widerlegt.

Neben den in diesem Kapitel diskutierten qualitativen Unterschieden in den SEHRS-

und SERS-Spektren von *p*MBA bei den unterschiedlichen pH-Werten sind für die im nahen Infrarot angeregten SEHRS- und SERS-Spektren bei einigen der Partikelsorten die Intensitäten aller Banden bei sehr sauren und sehr basischen pH-Werten geringer als bei neutralem pH-Wert (Abb. 4.3 und 4.7). Dies deutet auf eine geringere Oberflächenverstärkung bei extremen pH-Werten hin, die in Abschnitt 7.3 diskutiert wird.

Kapitel 5

Oberflächenverstärkte resonante Hyper-Raman-Streuung am Beispiel von Carotinoiden

Carotinoide sind in der Natur weit verbreitet, haben aufgrund ihres ausgedehnten π -Elektronensystems interessante optische Eigenschaften und wurden daher schon vielfach spektroskopisch untersucht (siehe Abschnitt 2.2.2). Bei Raman-spektroskopischen Untersuchungen von Carotinoiden kann die intensive Absorption der Carotinoide im Bereich des sichtbaren Lichts ausgenutzt werden, um einen Resonanzverstärkungseffekt auf die Raman-Streuung zu erzielen.^[34,35,37] Dieser Verstärkungseffekt wirkt sich allerdings nur auf diejenigen Raman-Banden aus, die auf die chromophoren Gruppen in den Molekülen zurückzuführen sind.^[43] Oberflächenverstärkung an nanostrukturierten Metalloberflächen ermöglicht wesentlich empfindlichere Messungen als Resonanzverstärkung, auch bei Anregung weit entfernt von der Absorptionsbande eines Analyten, und kann somit zusätzliche strukturelle Informationen über die Carotinoide selbst und über ihre Wechselwirkung mit der Metalloberfläche liefern. Dieses Potential wurde bisher nur wenig genutzt, da die meisten Carotinoide keine funktionellen Gruppen mit der für eine verlässliche Adsorption erforderlichen Affinität zu den Metalloberflächen besitzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das thiofunktionalisierte Carotin 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin (**5** in Abb. 2.3 auf S. 31) und nicht-funktionalisiertes β -Carotin (**6** in Abb. 2.3) mittels nicht-resonanter oberflächenverstärkter Raman-Streuung (SERS), oberflächenverstärkter Resonanz-Raman-Streuung (SERRS) und resonan-

ter oberflächenverstärkter Hyper-Raman-Streuung (SEHRS) in Gegenwart von Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurden, untersucht. Aus dem Vergleich dieser Spektren lassen sich Rückschlüsse ziehen auf die Wechselwirkung der Carotinmoleküle mit der Silberoberfläche und auf den Einfluss des Resonanz-Raman-Effekts auf die Spektren bei den verschiedenen Anregungsbedingungen.

5.1 Allgemeine Charakterisierung der Carotinoide

Das thiolfunktionalisierte Carotin 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin wurde nach einer bekannten Synthesevorschrift hergestellt^[135,136] und anhand seiner Kernspinresonanzspektren (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR-Spektren) nachgewiesen. Die NMR-Spektren der Zwischenprodukte und des Endproduktes (S. 39 ff in Kapitel 3) konnten unter Zuhilfenahme der bekannten NMR-Daten des Carotinthiols^[136] sowie weiterer ähnlicher Carotine^[172–176] prinzipiell den erwarteten Verbindungen zugeordnet werden. Zudem bestätigt das Extinktionsspektrum (Abb. 5.1 a) der hergestellten Substanz, dass das Carotinthiol erhalten wurde.^[137] Jedoch zeigen die NMR-Spektren zusätzliche Signale, die nicht den Carotinen zugeordnet werden können und auf Verunreinigungen hinweisen. Insbesondere die nicht den Carotinen zugeordneten Signale bei großen chemischen Verschiebungen, sowohl in den ^1H -NMR-Spektren als auch in den ^{13}C -NMR-Spektren, deuten auf Reste von Triphenylphosphinoxid hin,^[177,178] das in der ersten Synthesestufe als Nebenprodukt entsteht. Die Reinheit der erhaltenen Substanz wurde anhand der Extinktion des Carotinthiols bei 472 nm mit Hilfe des Extinktionsko-

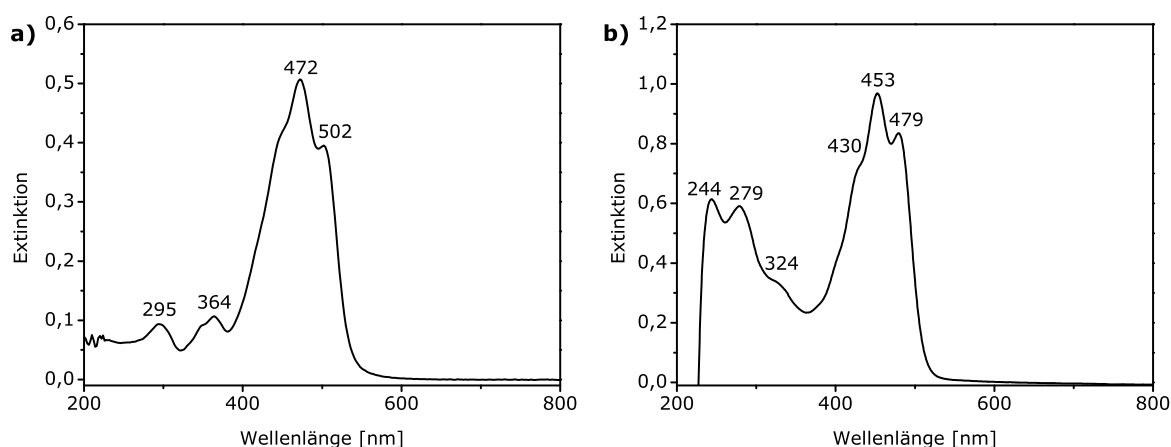


Abb. 5.1: Extinktionsspektren von (a) 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin, $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Dichlormethan und (b) β -Carotin, $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ in Ethanol.

effizienten von $1,5 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^[137] zu 41 % bestimmt. Somit konnten Lösungen mit definierten Konzentrationen des Carotinthiols für die Raman-Experimente hergestellt werden. Wie in den folgenden Abschnitten gezeigt wird, zeigen die Raman-Spektren und SERS-Spektren ausschließlich Signale, die dem Carotin-Gerüst zugeordnet werden können. Dies lässt sich durch den großen Raman-Streuquerschnitt von Carotin und unter Umständen durch eine selektive Verstärkung der Carotin-Signale durch die Silbernanopartikel begründen und führt dazu, dass die Reinheit des Syntheseproduktes für die Raman-Experimente nicht relevant ist.

Das Absorptionsmaximum des funktionalisierten Carotins ist gegenüber dem des nicht-funktionalisierten Carotins geringfügig rotverschoben (vgl. Abb. 5.1 a und 5.1 b). Für beide Carotine sind jedoch bei Anregung von Raman-Spektren bei einer Wellenlänge von 532 nm bzw. bei Anregung von Hyper-Raman-Spektren bei einer Wellenlänge von 1064 nm Präresonanzbedingungen erfüllt.

Für die in den folgenden Abschnitten diskutierten SEHRS- und SERS-Experimente wurden Silbernanopartikel in Wasser verwendet. Da beide Carotine in Wasser schlecht löslich sind, wurden verschiedene Lösungsmittelgemische getestet. Stark unpolare Lösungsmittel würden zwar die Carotine gut lösen, sollten in diesem Zusammenhang zur Herstellung der Carotinlösungen jedoch nicht verwendet werden, da sie nicht mit den wässrigen kolloidalen Silbernanopartikellösungen mischbar sind und somit keinen Zugang der Carotinmoleküle zur Silberoberfläche ermöglichen. Ethanol ist gut mit Wasser mischbar und löst Carotine etwas besser als Wasser.¹ Bei einem Ethanol-Anteil von 8-10 % (v/v) in der Lösung konnten für die hier verwendeten geringen Carotinkonzentrationen reproduzierbare Spektren erhalten werden. Geringere Ethanol-zu-Wasser-Verhältnisse führten aufgrund von Inhomogenitäten in den Lösungen zu schlechteren Reproduzierbarkeiten mit teils sehr intensiven und teils gar keinen Signalen in den Raman- und SERS-Spektren.

Da bekannt ist, dass 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin über die Thiolgruppe an Goldoberflächen chemisorbiert,^[137] und Thiole allgemein auch mit Silber starke Bindungen ausbilden,^[138,139] wurde erwartet, dass die Thiolfunktionalisierung zu einer Verbesserung der Wechselwirkung des Carotins mit den Silbernanopartikeln führt und somit eine Beobachtung von oberflächenverstärkten Raman- und Hyper-

¹Die relative Löslichkeit von β -Carotin in Ethanol im Vergleich mit anderen organischen Lösungsmitteln, also ein Mindestwert für die Löslichkeit, wird als 30 mg L^{-1} angegeben.^[179] Das entspricht $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, was für SERS-Experimente und resonante Raman-Experimente eine vergleichsweise hohe Konzentration ist.

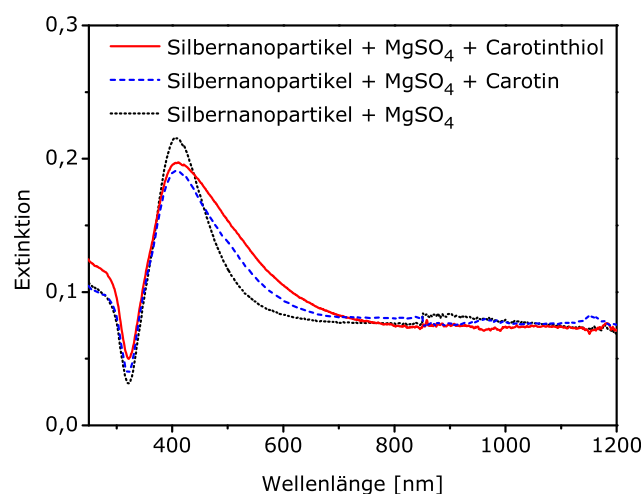


Abb. 5.2: Extinktionsspektren der mit MgSO₄ aggregierten Silbernanopartikel mit 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin bzw. der Silbernanoaggregate mit nicht funktionalisiertem β -Carotin und ohne Carotine. Die Herstellung der Gemische erfolgte ebenso wie für die SEHRS-Experimente in Abschnitt 5.4, mit den gleichen Konzentrationen der jeweiligen Komponenten.

Raman-Spektren des β -Carotin-Grundgerüsts erleichtert wird. Allerdings wurde die Adsorption des Carotinthiols bisher auf einer ebenen Goldoberfläche und in organischer Lösung untersucht,^[137] während in dieser Arbeit kolloidale Silbernanopartikel in wässriger Lösung verwendet werden. In wässriger Lösung bilden Carotinoide molekulare Aggregate,^[126] was sowohl Adsorptionsprozess und -geometrie als auch die optischen Eigenschaften beeinflussen kann.

Die optischen Eigenschaften sowohl der Carotinoide als auch der Silbernanopartikel können zudem durch eine Wechselwirkung von beiden beeinflusst werden. Abb. 5.2 zeigt die Extinktionsspektren der Silbernanoaggregate wie sie für die SEHRS-Experimente in Abschnitt 5.4 verwendet wurden vor und nach der Zugabe der Carotinlösungen. Die Spektren zeigen eine Verbreiterung der Plasmonenbande in Gegenwart der Carotine. Dies kann eine einfache Überlagerung der Plasmonenbande mit der Absorptionsbande der Carotine sein, kann aber auch auf eine Wechselwirkung zwischen Carotinen und Silbernanopartikeln hindeuten, insbesondere unter Berücksichtigung der Abnahme der Extinktion im Maximum der Bande.

5.2 Oberflächenverstärkungen für thiofunktionalisiertes und nicht funktionalisiertes Carotin

Das Ziel der Verwendung des funktionalisierten Carotins war eine Erhöhung der Affinität der Moleküle zur Silberoberfläche um eine größere Oberflächenverstärkung der Raman-Signale und damit eine umfassendere Charakterisierung von Carotin mit SERS zu ermöglichen. Dies soll nun zuerst anhand des Vergleichs der SERRS-Spektren von funktionalisiertem (Abb. 5.3 a-c) und nicht funktionalisiertem Carotin (Abb. 5.3 d-f) untersucht werden. Qualitativ sind die SERRS-Spektren der beiden Carotine sehr

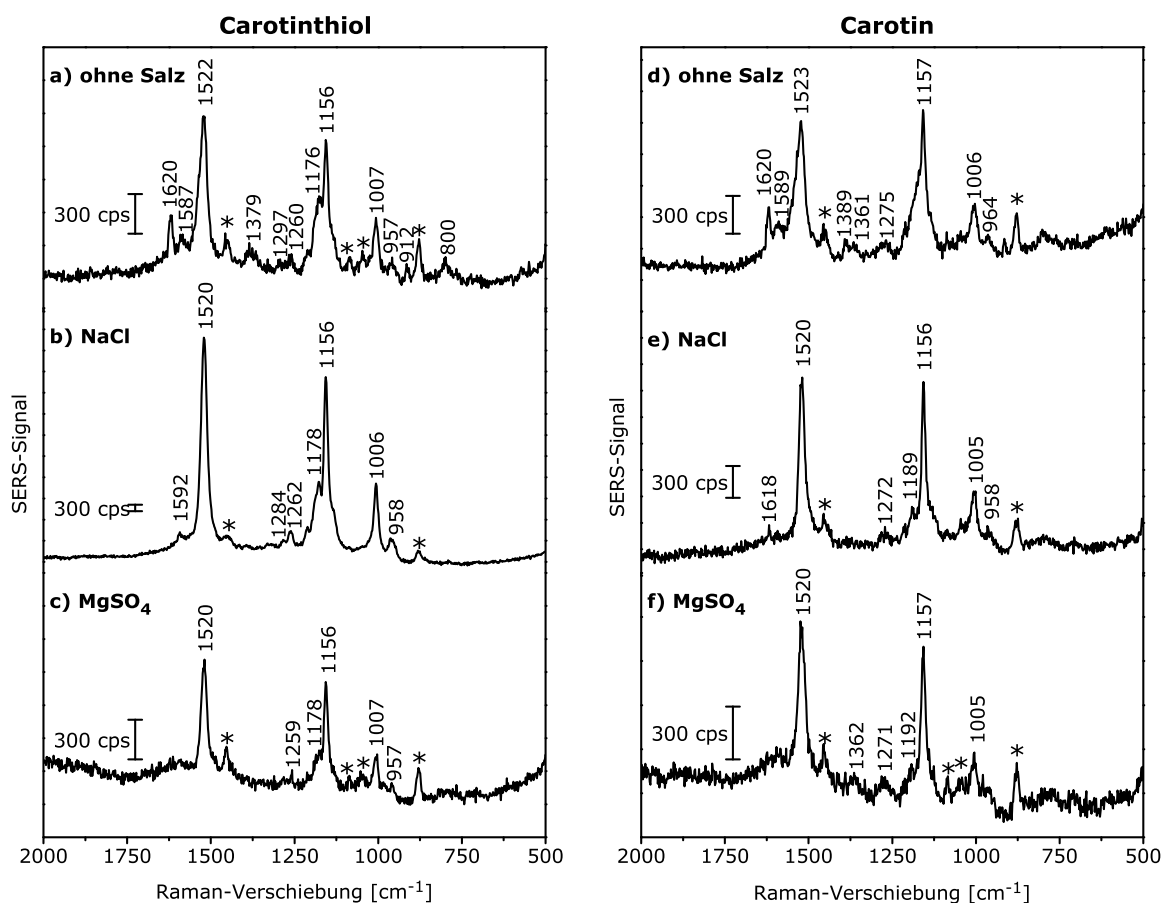


Abb. 5.3: SERRS-Spektren von (a-c) 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und (d-f) β -Carotin in Gegenwart unterschiedlicher Salze: (a,d) ohne Salz, (b,e) $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NaCl, (c,f) $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ MgSO₄. Konzentrationen der Carotine: (a,d,e) $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (b) $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $3 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $3 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Anregungswellenlänge: 532 nm, Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{24} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 1 s. Mit einem Stern markierte Banden sind auf das Ethanol im Lösungsmittel zurückzuführen.

ähnlich und weisen Banden auf, die für resonante Raman- und SERS-Spektren von β -Carotin in der Literatur gut bekannt sind.^[36,111,133] Werden die Silbernanopartikel ohne weitere Zusätze mit den Carotinlösungen gemischt, sind die SERRS-Signale für beide Carotine ungefähr gleich intensiv (vgl. Abb. 5.3 a und 5.3 d). Im Vergleich mit normalen Raman-Spektren von Carotinlösungen wurden aus den SERRS-Spektren in Abb. 5.3 a und 5.3 d relativ geringe Verstärkungsfaktoren von 2-4 für beide Carotine ermittelt. Werden den kolloidalen Nanopartikellösungen Salze zugegeben, sind die Signalintensitäten und Verstärkungsfaktoren, in Übereinstimmung mit Experimenten mit anderen Analyten,^[19,54,180–182] grundsätzlich größer, wobei sich durch Magnesiumsulfat eine größere Verstärkung erzielen lässt als durch Natriumchlorid (Abb. 5.3 b-c und e-f und Tabelle 5.1). Es fällt auf, dass in Gegenwart der Salze die Signale für das Carotinthiol bei gleicher Carotinkonzentration intensiver sind (vgl. Abb. 5.3 b und Abb. 5.3 e) bzw. kleinere Konzentrationen detektierbar sind (vgl. Abb. 5.3 c und Abb. 5.3 f) als für das nicht funktionalisierte Carotin. Die Verstärkungsfaktoren sind in Gegenwart der Salze für das Carotinthiol etwa um einen Faktor 10 größer als für das nicht funktionalisierte Carotin (Tabelle 5.1). Dies lässt darauf schließen, dass die Wechselwirkung zwischen dem Carotinthiol und den Silbernanopartikeln, zumindest

Tabelle 5.1: Verstärkungsfaktoren für die SERRS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und nicht funktionalisiertem β -Carotin mit Silbernanopartikeln in Gegenwart verschiedener Salze. Untersucht wurden die C=C- bzw. C-C-Streckschwingungsbanden bei 1520 cm^{-1} bzw. 1155 cm^{-1} . Als Referenz zur Berechnung der Verstärkungsfaktoren dienten Raman-Spektren des jeweiligen Carotins bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$.

| Salz | Salzkonzentration [mol L ⁻¹] | Carotinkonzentration [mol L ⁻¹] | Verstärkungsfaktor | |
|-------------------|---|--|--------------------|-------------------|
| | | | Carotinthiol | Carotin |
| - | - | $3 \cdot 10^{-6}$ | 3 | 2 |
| | | $3 \cdot 10^{-7}$ | 4 | 4 |
| NaCl | $8 \cdot 10^{-3}$ | $3 \cdot 10^{-6}$ | n.b. ^a | 7 |
| | | $3 \cdot 10^{-7}$ | $3 \cdot 10^2$ | 10 |
| | | $3 \cdot 10^{-8}$ | $6 \cdot 10^2$ | n.b. ^a |
| MgSO ₄ | $8 \cdot 10^{-3}$ | $3 \cdot 10^{-7}$ | n.b. ^a | $2 \cdot 10^2$ |
| | | $3 \cdot 10^{-8}$ | $1 \cdot 10^4$ | $4 \cdot 10^2$ |
| | | $3 \cdot 10^{-9}$ | $2 \cdot 10^3$ | n.b. ^a |

^a n.b. - nicht bestimmt

in Gegenwart von Salzen, die die Oberflächenladung der Nanopartikel verändern und Aggregate der Partikel erzeugen,^[54,180,181] stärker ist als zwischen dem nicht funktionalisierten Carotin und der Silberoberfläche.

Insgesamt sind die Verstärkungsfaktoren für beide Carotine (Tabelle 5.1), im Vergleich mit denen für andere Analyten^[65,183], relativ gering. Dies kann einerseits auf eine schwache Wechselwirkung hindeuten, kann aber auch dadurch erklärt werden, dass durch die Anregung in Resonanz mit dem elektronischen Übergang des Carotins eine Kopplung zwischen diesem Übergang und den Oberflächenplasmonen des Silbers induziert wird,^[134] die zu einer Abschwächung der plasmonischen Verstärkung führt.^[30–32]

Die stärkere Wechselwirkung des Carotinthiols mit der Silberoberfläche ist auch in den nicht-resonant bei einer Wellenlänge von 1064 nm angeregten SERS-Spektren der beiden Carotine zu erkennen (Abb. 5.4). Während für das nicht funktionalisierte Carotin auch bei Integrationszeiten von mehreren Minuten nur sehr schwache Signale zu beobachten sind, sind im Spektrum des Carotinthiols, das unter den gleichen experimentellen Bedingungen erhalten wurde, deutliche Banden zu erkennen (Abb. 5.4), deren Positionen vergleichbar sind mit den Bandenpositionen in den SERRS-Spektren (Abb. 5.3) und die eine qualitative Interpretation der Spektren erlauben (siehe Abschnitt 5.5). Die Intensität der C-C-Streckschwingungsbande bei 1155 cm^{-1} ist im

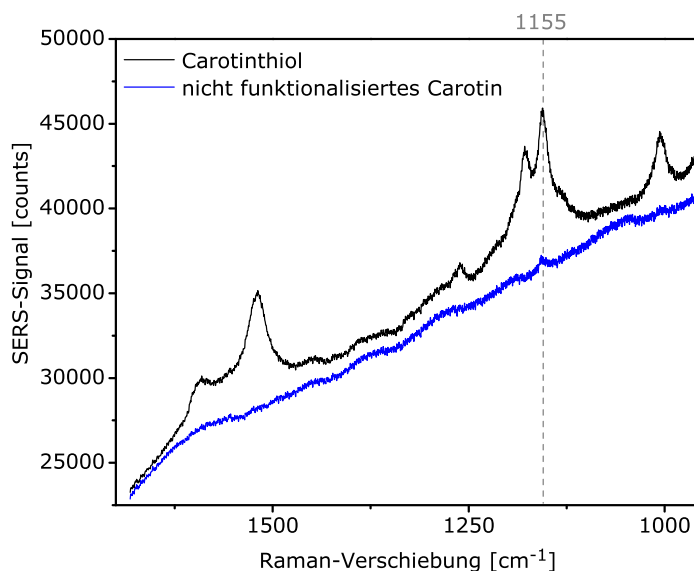


Abb. 5.4: SERS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin (oberes Spektrum) und β -Carotin (unteres Spektrum). Konzentration der Carotine: $3 \cdot 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$, Anregungswellenlänge: 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $3 \cdot 10^{28}\text{ Photonen cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 120 s.

SERS-Spektrum des Carotinthiols um einen Faktor von 9 intensiver als im SERS-Spektrum des nicht funktionalisierten Carotins (Abb. 5.4). Es kann hier nur der absolute Unterschied in den Signalintensitäten zwischen den beiden Carotinen betrachtet werden, da bei nicht-resonanter Anregung keine Raman-Spektren von Carotininlösungen ohne Silber erhalten und somit keine Verstärkungsfaktoren ermittelt werden konnten. Bei einem solchen Vergleich kann ein Einfluss eventueller Unterschiede in den Raman-Streuquerschnitten ebenfalls eine Rolle spielen. Ein solcher Unterschied ist denkbar, da im Carotinthiol nicht nur eine zusätzliche Thiolgruppe vorhanden ist, sondern durch den zusätzlichen aromatischen Ring auch das π -System größer ist als im nicht funktionalisierten Carotin (siehe Abb. 2.3 auf S. 31). Für die SERRS- und resonanten Raman-Spektren wurde jedoch keine entsprechende Beobachtung gemacht und da der Intensitätsunterschied der SERS-Signale quantitativ dem der SERRS-Signale entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass er ebenso auf einer größeren Verstärkung durch die Silbernanopartikel, und demnach einer stärkeren Wechselwirkung des Carotinthiols mit der Silberoberfläche, beruht.

5.3 Wechselwirkung der Carotinoide mit der Silberoberfläche

Wie in Abschnitt 5.2 diskutiert, ist für das Carotinthiol eine größere Intensität der SERS- und SERRS-Signale zu beobachten als für nicht funktionalisiertes Carotin, was durch eine stärkere Wechselwirkung des Carotinthiols mit der Silberoberfläche erklärt werden kann. Im Folgenden soll die Art dieser Wechselwirkung weitergehend untersucht werden.

Dazu wird zunächst der Bedeckungsgrad der Silberoberfläche mit Carotinmolekülen in den Experimenten betrachtet. Die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Silbernanopartikel, die für die SERRS-Experimente verwendet wurden, haben einen mittleren Durchmesser von (42 ± 15) nm und eine Partikelkonzentration von $7 \cdot 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$. Nimmt man den Platzbedarf eines Carotinthiolmoleküls auf einer Goldoberfläche bei orthogonaler Orientierung von $0,25 \text{ nm}^2$ ^[137] als Grundlage, ergibt sich daraus ein Bedeckungsgrad von 20 % bei einer Carotinthiolkonzentration von $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ bzw. von 0,02 % bei einer Carotinthiolkonzentration von $3 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Die Bedeckung der Silberoberfläche ist also bei allen verwendeten Konzentrationen geringer als eine Monolage. Falls die Moleküle auf der Silbernanopartikeloberfläche eine

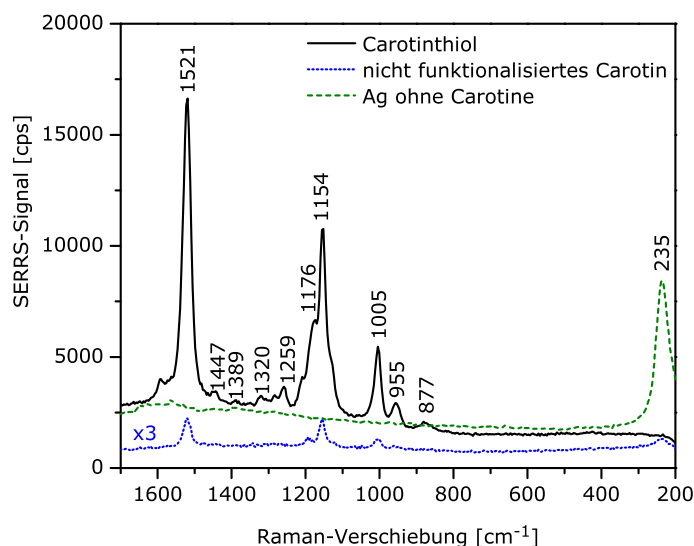


Abb. 5.5: Vergleich der SERRS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin ($3 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) und β -Carotin ($10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) mit dem Spektrum der Silbernanoaggregate ohne Carotinmoleküle. Das Spektrum des nicht funktionalisierten Carotins wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit einem Faktor von 3 multipliziert. Anregungswellenlänge: 514 nm, Photonenflussdichte: $2 \cdot 10^{23} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 1 s.

andere Orientierung einnehmen als auf der Goldoberfläche und damit mehr Platz pro Molekül benötigt würde, könnte bei der höchsten Konzentration von $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ eine vollständige Monolage erreicht werden. Für das nicht funktionalisierte β -Carotin gibt es keine verfügbaren Daten zur Adsorption an Metalloberflächen, aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Carotine kann jedoch von einem mit dem Carotinthiol vergleichbaren Platzbedarf ausgegangen werden.

Um zu untersuchen, ob eine Chemisorption des Carotinthiols unter Bildung einer Ag-S-Bindung stattfindet, wurde der Bereich zwischen 200 cm^{-1} und 250 cm^{-1} in SERRS-Spektren der Carotine betrachtet. In diesem Bereich sind Streckschwingungen von Bindungen zwischen Silber und verschiedenen anderen Elementen zu beobachten.^[139,184,185] Das Spektrum der Silbernanopartikel ohne Carotinmoleküle weist eine intensive Bande bei 235 cm^{-1} auf (Abb. 5.5, grünes Spektrum), die auf während der Synthese der Nanopartikel an der Oberfläche gebundenes Chlorid oder Hydroxylamin bzw. dessen Oxidationsprodukte zurückgeführt werden kann. Bei Zugabe von β -Carotin nimmt die Intensität dieser Bande deutlich ab (Abb. 5.5, blaues Spektrum) und bei Zugabe von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin verschwindet sie vollständig (Abb. 5.5, schwarzes Spektrum). Daraus lässt sich schließen, dass durch Zugabe der Carotine ein Austausch der an der Silberoberfläche adsorbierten Spezi-

es stattfindet. Der Umfang dieses Austausches ist für das Carotinthiol größer als für das nicht funktionalisierte Carotin, wie an der verbleibenden schwachen Bande bei 235 cm^{-1} im Spektrum des nicht funktionalisierten Carotins zu erkennen ist (Abb. 5.5). Dies zeigt, in Übereinstimmung mit der größeren Signalintensität in den SERRS- und SERS-Spektren (siehe Abschnitt 5.2), die stärkere Wechselwirkung des funktionalisierten Carotins mit der Silberoberfläche. Allerdings tritt im SERRS-Spektrum des Carotinthiols im Bereich zwischen 200 cm^{-1} und 250 cm^{-1} auch keine neue Bande auf (Abb. 5.5), wie bei der Ausbildung einer Ag-S-Bindung zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise ist die Bande der Ag-S-Streckschwingung im SERRS-Spektrum nicht detektierbar, da eine solche Schwingung im Gegensatz zum Carotin-Gerüst nicht von der Resonanzverstärkung profitieren würde. Allerdings kann die Abwesenheit von Banden in diesem niederfrequenten Bereich auch darauf hindeuten, dass bei der Adsorption des Carotinthiols keine kovalente Ag-S-Bindung ausgebildet wird. Die wahrscheinlichste alternative Wechselwirkung findet über das π -System statt. Bei dieser Wechselwirkung werden die Moleküle weniger stark an die Oberfläche gebunden und sie ist grundsätzlich für beide Carotine möglich. Im funktionalisierten Carotin ist das π -System aufgrund des zusätzlichen aromatischen Rings größer, was dazu führt, dass ein größerer Teil pro Molekül flach auf der Silberoberfläche liegen und eine stärkere Wechselwirkung stattfinden kann.

5.4 Oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung der Carotinoide

Die oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung (SEHRS) als ein nichtlinearer Zweiphotonenprozess folgt anderen Symmetrierauswahlregeln als die einphotonenangeregte SERS^[1,2,186] und ermöglicht zusätzliche Einblicke in die Wechselwirkungen an Molekül-Silber-Grenzflächen^[10–12] (siehe auch Abschnitt 2.1 und Kapitel 4). Daher ist SEHRS eine die in den Abschnitten 5.2 und 5.3 beschriebenen SERS- und SERRS-Experimente ergänzende Möglichkeit zur Untersuchung von Carotin auf Silbernanopartikeloberflächen. Im Folgenden werden SEHRS-Spektren diskutiert, die bei einer Wellenlänge von 1064 nm angeregt wurden, sodass sich auch hier ein Resonanzeffekt ergibt, da die zweite Harmonische dieser Wellenlänge und damit auch die Hyper-Raman-Streuung im Bereich der Absorptionsbande der Carotine liegen.

SEHRS-Spektren der Carotine konnten, ebenso wie die bei 1064 nm angeregten

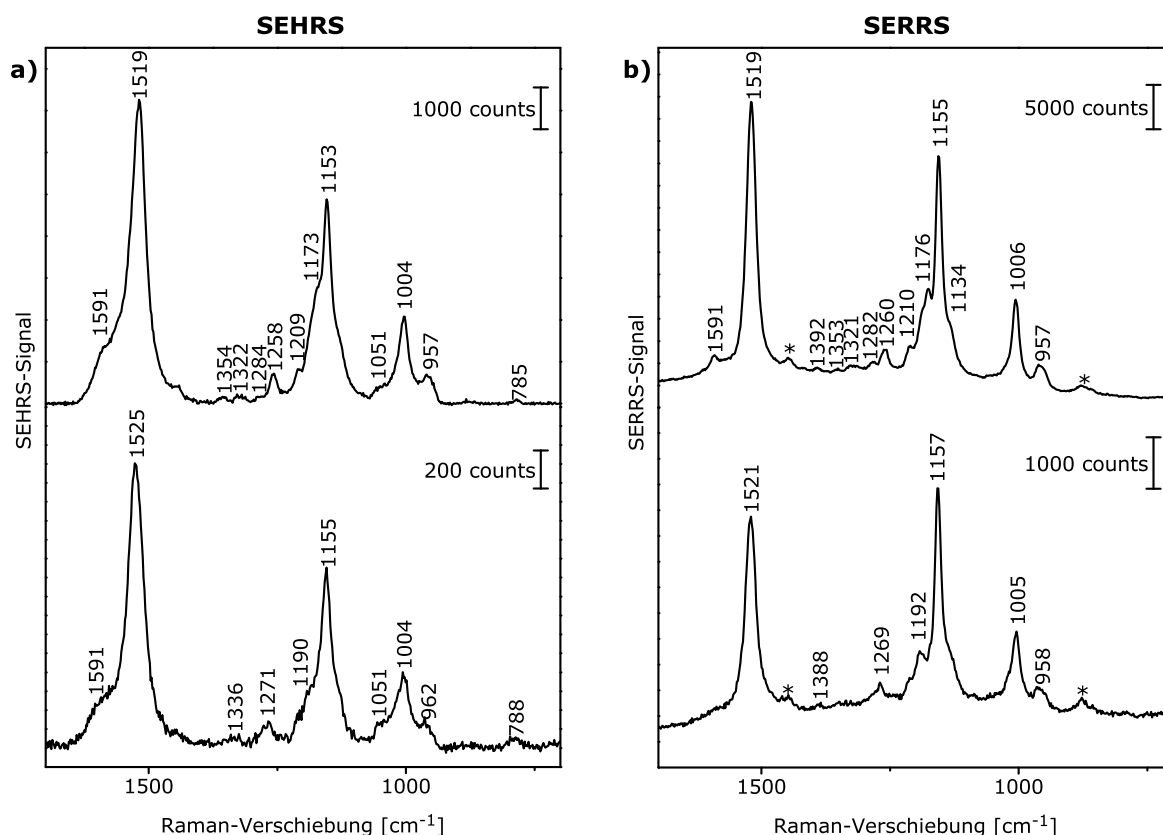


Abb. 5.6: (a) SEHRS-Spektren und (b) SERRS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin (jeweils oberes Spektrum) und β -Carotin (jeweils unteres Spektrum). Endkonzentration der Carotine in den Lösungen: $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, Anregungsparameter: (a) 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{28} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 120 s, (b) 532 nm, Photonenflussdichte: $7 \cdot 10^{23} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 0,1 s. Die Spektren in (a) sind Mittelwerte aus jeweils 10 basislinienkorrigierten Spektren. Banden, die in (b) mit einem Stern markiert sind, sind dem Ethanol im Lösungsmittel zuzuordnen.

SERS-Spektren, nur nach Zugabe von MgSO_4 zu den Silbernanopartikeln erhalten werden. Zudem muss die Nanopartikelkonzentration für SEHRS-Experimente verringert werden (siehe Abschnitt 7.2). Daher wurden, um einen direkten Vergleich zwischen Ein- und Zweiphotonenanregung zu ermöglichen, quasisimultan mit den SEHRS-Spektren (Abb. 5.6 a) von denselben Probelösungen SERRS-Spektren mit Anregung bei 532 nm aufgenommen (Abb. 5.6 b). Zudem werden normale Raman- und Hyper-Raman-Spektren der festen Carotine ohne Silber zum Vergleich herangezogen (Abb. 5.7). Eine Übersicht über alle Banden in den SEHRS- und SERRS-Spektren aus Abb. 5.6 und deren Zuordnung ist in Tabelle 5.2 gegeben.

Aufgrund der verschiedenen Endgruppen der beiden Carotine und der in den Ab-

Tabelle 5.2: Bandenpositionen in cm^{-1} und Zuordnungen^[36,111,123] für die SEHRS- und SERS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und β -Carotin.

| 7'-Apo-7'-(4-mercapto- methylphenyl)- β -carotin | | β -Carotin | | |
|---|------|------------------|------|---|
| SEHRS | SERS | SEHRS | SERS | Zuordnung ^a |
| 1591 | 1591 | 1591 | | ν (C7=C8, C7'=C8'); für SEHRS außerdem: ν (C9=C10, C9'=C10', C11=C12, C11'=C12', C13=C14, C13'=C14') |
| 1519 | 1519 | 1525 | 1521 | ν (C11=C12, C11'=C12', C13=C14, C13'=C14', C15=C15') |
| | 1392 | | 1388 | δ (C19H ₃ , C20H ₃) |
| 1354 | 1353 | | | δ (C20H ₃ , C20'H ₃ , C14-H) |
| | | 1336 | | δ (C20H ₃ , C20'H ₃ , C14-H, C7-H, C7'-H, C8-H), ν (C7=C8, C11=C12, C15=C15') |
| 1322 | 1321 | | | δ (C7-H, C7'-H, C8-H), ν (C7=C8, C11=C12, C15=C15') |
| 1284 | 1282 | | | δ (CH ₂ in Ionon-Ring) |
| 1258 | 1260 | 1271 | 1269 | δ (C11-H, C11'-H) |
| 1209 | 1210 | | | ν (C12-C13, C15=C15') |
| 1173 | 1176 | 1190 | 1192 | ν (C8-C9, C8'-C9') |
| 1153 | 1155 | 1155 | 1157 | ν (C10-C11, C10'-C11', C14-C15, C14'-C15') |
| | 1134 | | | δ (CH ₂ in Ionon-Ring) |
| 1051 | | 1051 | | Ionon-Ring |
| 1004 | 1006 | 1004 | 1005 | δ (CH ₃) |
| 957 | 957 | 962 | 958 | δ (Ionon-Ring) |
| 785 | | 788 | | ν (C-C und C-CH ₃ in Ionon-Ring) |

^a ν Streckschwingung, δ Deformationsschwingung, zur Nummerierung der Kohlenstoffatome siehe Abb. 2.3 auf S. 31.

schnitten 5.2 und 5.3 festgestellten stärkeren Wechselwirkung des Carotinthiols mit der Silberoberfläche könnte man zwischen den SEHRS-Spektren der beiden Carotine qualitative Unterschiede erwarten. Tatsächlich sind die C-C-Streckschwingungsbande und die C-H-Deformationsschwingungsbande, die im Spektrum des nicht funktionalisierten

Carotins bei 1190 cm^{-1} bzw. 1271 cm^{-1} zu finden sind (Abb. 5.6 a, unteres Spektrum), im Spektrum des Carotinthiols verschoben zu 1173 cm^{-1} bzw. 1258 cm^{-1} (Abb. 5.6 a, oberes Spektrum). Diese Verschiebungen sind ebenso wie in den SEHRS-Spektren (Abb. 5.6 a) auch in den SERRS-Spektren (Abb. 5.6 b) und in den Raman- und Hyper-Raman-Spektren der Feststoffe (Abb. 5.7) zu beobachten. Daher sind sie weder bedingt durch eine spezielle Mehrphotonenauswahlregel, noch lassen sie sich durch eine unterschiedliche Wechselwirkung mit der Silberoberfläche begründen. Vielmehr belegen sie den grundsätzlichen strukturellen Unterschied der beiden Carotine. Interessanterweise sind beides Schwingungen in der Polyenkette der Moleküle, die sich prinzipiell in den beiden Carotinen nicht unterscheidet. Der Austausch der Endgruppe durch die Funktionalisierung übt also einen indirekten Einfluss auf die SEHRS-Spektren aus, indem der zusätzliche Phenylring im Carotinthiol eine Veränderung im mesomeren System der Polyenkette verursacht. Ein direkter Einfluss, etwa durch zusätzliche Banden des Phenylrings in den Spektren, konnte nicht beobachtet werden, weder in den SEHRS-

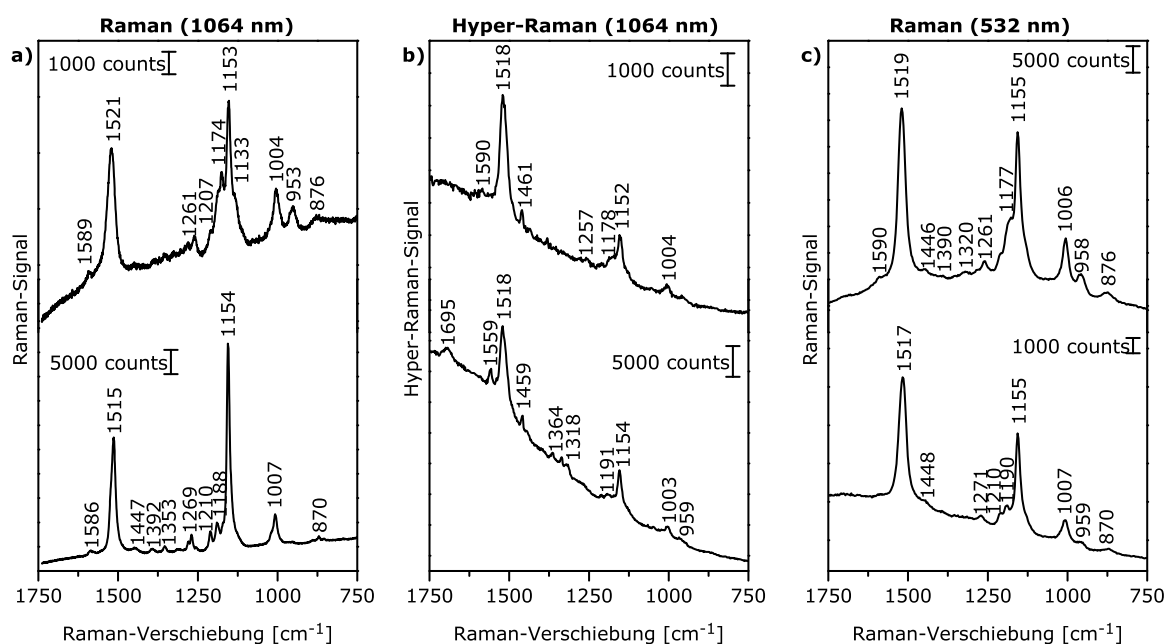


Abb. 5.7: (a) Nicht-resonant angeregte Raman-Spektren, (b) Hyper-Raman-Spektren und (c) resonant angeregte Raman-Spektren von Feststoffproben von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)-β-carotin (jeweils oberes Spektrum) und β-Carotin (jeweils unteres Spektrum). Anregungsparameter: (a) 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $3 \cdot 10^{27}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, Integrationszeit: 20 s, (b) 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $1 \cdot 10^{28}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, Integrationszeit: 600 s, (c) 532 nm, Photonenflussdichte: $1 \cdot 10^{23}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (oberes Spektrum), $5 \cdot 10^{23}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (unteres Spektrum), Integrationszeit: 1 s.

oder SERRS-Spektren, noch in den Spektren der festen Proben. Dies ist vermutlich auf die große Resonanzverstärkung und den allgemein großen Streuquerschnitt der Banden des Carotingerüsts, vor allem der Polyenkette, zurückzuführen.

Beim Vergleich der SEHRS- und SERRS-Spektren fällt zunächst eine Schulter bei 1051 cm^{-1} auf, die für beide Carotine in den SEHRS-Spektren (Abb. 5.6 a) auftritt, nicht aber in den SERRS-Spektren (Abb. 5.6 b). Eine Bande an dieser Position ist nicht in einphotonenangeregten Raman-Spektren, aber in Infrarotabsorptionsspektren von β -Carotin zu finden und kann einer Schwingung des Iononrings zugeordnet werden.^[111] Das Auftreten dieser Bande in den SEHRS-Spektren veranschaulicht die Tatsache, dass die Symmetrierauswahlregeln für Hyper-Raman-Streuung, insbesondere für zentrosymmetrische Moleküle wie β -Carotin, den Auswahlregeln der Infrarotabsorption theoretisch ähnlicher sind als denen der Raman-Streuung.^[1]

Ein weiterer Unterschied zwischen den SEHRS- und SERRS-Spektren besteht in der Bande bei 1591 cm^{-1} , die im SERRS-Spektrum des Carotinthiols (Abb. 5.6 b, oberes Spektrum) eine separate Bande ist, während sie in den SEHRS-Spektren als Schulter der Bande bei 1520 cm^{-1} auftritt und gleichzeitig an relativer Intensität, verglichen mit der Bande bei 1520 cm^{-1} , zunimmt (Abb. 5.6 a). Dies kann zum einen auf eine Verschiebung der Bande hindeuten, zum anderen ist es möglich, dass die Schulter in den SEHRS-Spektren Beiträge von zusätzlichen Banden mit geringerer Raman-Verschiebung beinhaltet. Die Bande bei 1591 cm^{-1} kann einer C=C-Streckschwingung zugeordnet werden, neben der in normalen Raman-Spektren von β -Carotin eine weitere C=C-Streckschwingung bei ungefähr 1580 cm^{-1} auftritt.^[36] Es ist demnach möglich, dass die Bande bei 1580 cm^{-1} in den SERRS-Spektren zwar zu schwach ist um erkennbar zu sein, in den SEHRS-Spektren aber selektiv verstärkt wird. Die Beiträge verschiedener Moden bzw. die genaue Position von Schultern in Raman-Spektren lassen sich mit Hilfe der in der zweiten Ableitung des Spektrums enthaltenen Information über die Krümmung in jedem Punkt des Spektrums identifizieren.^[187] Die zweite Ableitung des SEHRS-Spektrums von Carotinthiol deutet auf eine weitere Bande bei 1564 cm^{-1} hin (Abb. 5.8). Eine solche Bande kann einer infrarotaktiven, aber Raman-inaktiven C=C-Streckschwingung zugeordnet werden,^[111] die neben anderen infrarotaktiven Banden in Hyper-Raman-Spektren von β -Carotin bei Anregung mit kürzeren Wellenlängen die intensivste Bande darstellt.^[123,188]

Die Hyper-Raman-Spektren von β -Carotin ohne Silbernanopartikel weisen nicht nur eine Schulter, sondern eine deutliche Bande bei 1559 cm^{-1} auf, sowohl bei Mes-

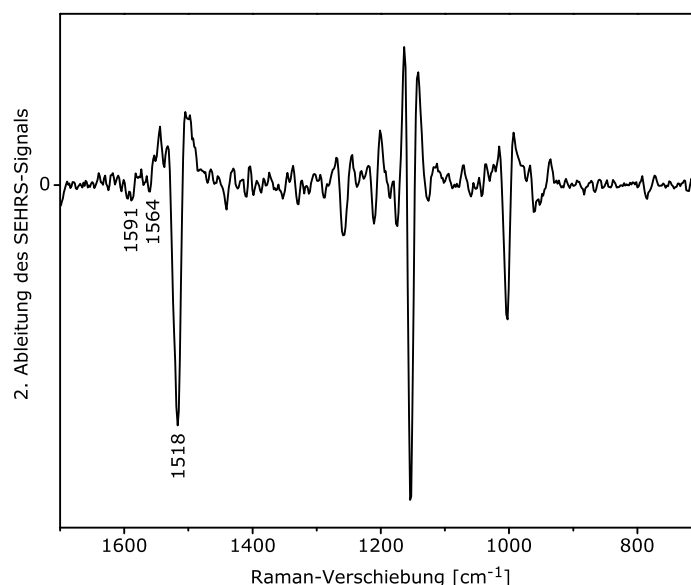


Abb. 5.8: Zweite Ableitung des SEHRS-Spektrums von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin in Abb. 5.6 a. Die Berechnung der zweiten Ableitung erfolgte durch zwei aufeinander folgende erste Ableitungen des Spektrums unter Verwendung einer Savitzky-Golay-Glättung^[160] mit einem Polynom 2. Grades über jeweils 5 Datenpunkte.

sungen im Feststoff (Abb. 5.7 b, unteres Spektrum) als auch in wässriger Lösung (Abb. 5.9 b). Die Hyper-Raman-Spektren des Carotinthiols hingegen (Abb. 5.7 b, oberes Spektrum und Abb. 5.9 a) zeigen weder diese Bande noch eine Schulter wie in den SEHRS-Spektren. Auch die zweite IR-aktive Bande, die in den SEHRS-Spektren beider Carotine bei 1051 cm^{-1} auftritt, ist bei Betrachtung der Hyper-Raman-Spektren der Carotinlösungen im Spektrum des nicht funktionalisierten Carotins (Abb. 5.9 b) intensiver als im Spektrum des Carotinthiols (Abb. 5.9 a), das eher einem einphotonenangeregten Raman-Spektrum entspricht. Dies zeigt, dass die höhere Symmetrie des nicht funktionalisierten Carotins und die theoretisch mit der höheren Symmetrie einhergehenden sich gegenseitig ausschließenden Auswahlregeln für Raman- und Hyper-Raman-Spektren in Abwesenheit der Silbernanopartikel eine größere Rolle spielen als für SEHRS. Bei Adsorption an die Silbernanopartikel wird hingegen die Symmetrie beider Carotine verändert, sodass die SEHRS-Spektren der beiden Carotine zueinander eine größere Ähnlichkeit haben als zu dem jeweils entsprechenden Hyper-Raman-Spektrum. In den Resonanz-Raman-Spektren (Abb. 5.7 c) und SERRS-Spektren (Abb. 5.6 b) sind derartige unterschiedliche Symmetrieeinflüsse nicht zu beobachten. Das stimmt überein mit einem früheren Vergleich der Resonanz-Raman-Spektren einer größeren Gruppe natürlich vorkommender Carotinoide, bei dem ebenfalls nur ein geringer Einfluss

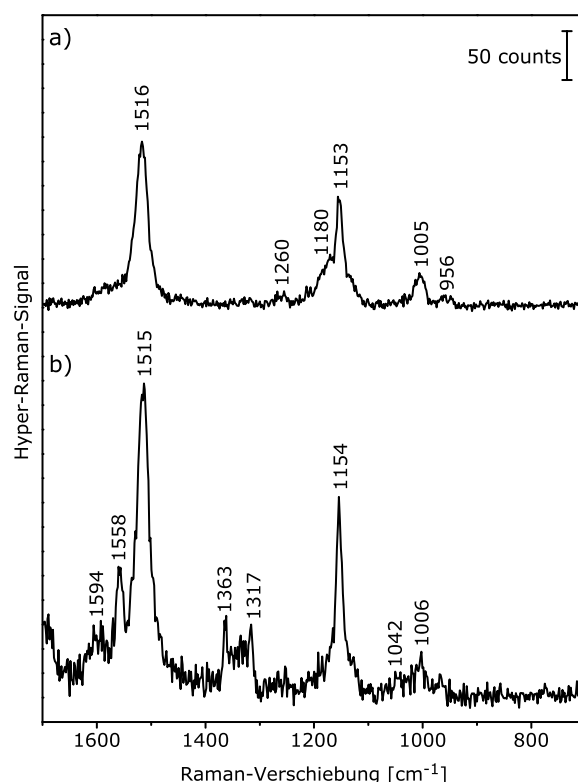


Abb. 5.9: Hyper-Raman-Spektren von (a) 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)-β-carotin ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) und (b) β-Carotin ($3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) in wässriger Lösung. Anregungswellenlänge: 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{28} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 120 s. Die dargestellten Spektren sind Mittelwerte aus jeweils 10 basislinienkorrigierten Spektren.

unterschiedlicher Endgruppen beobachtet wurde.^[114] Somit bietet die Hyper-Raman-Streuung spezifischere Strukturinformationen für die Analyse von Carotin als die einphotonenangeregte Raman-Streuung.

5.5 Einflüsse von Resonanz- und Oberflächenverstärkung auf die Raman-Spektren von Carotin

Insgesamt sind die SEHRS- und SERRS-Spektren (Abb. 5.6) bzw. die resonanten Raman- und Hyper-Raman-Spektren (Abb. 5.7 c und 5.7 b) von Carotin relativ ähnlich. Das bestätigt die Annahme, dass beide Prozesse grundsätzlich durch den gleichen elektronischen Übergang beeinflusst werden.^[189] Die wenigen dennoch bestehenden Unterschiede zwischen den ein- und zweiphotonenangeregten resonanten Raman-Spektren sollen im Folgenden, auch im Vergleich mit den nicht-resonanten Spektren, diskutiert

werden, um das Ausmaß von Resonanz- und Oberflächeneffekten unter den verschiedenen Anregungsbedingungen zu unterscheiden.

Das Auftreten infrarotaktiver Banden in den SEHRS-Spektren, aber nicht in den SERRS-Spektren, zeigt die unterschiedlichen Auswahlregeln der beiden Prozesse. Dennoch sind die zusätzlichen Banden in den SEHRS-Spektren relativ klein im Vergleich zu den drei dominanten Banden bei 1520 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} und 1004 cm^{-1} , die auch in den SERRS-Spektren auftreten. Auch die übrigen Banden in den SEHRS-Spektren (Abb. 5.6 a) haben ihre Positionen mit den entsprechenden Banden in den SERRS-Spektren (Abb. 5.6 b) gemeinsam, repräsentieren also die gleichen Schwingungen. Die relativen Intensitäten in den SEHRS- und SERRS-Spektren sind bis auf zwei Ausnahmen, die weiter unten diskutiert werden sollen, vergleichbar. Dahingegen sind die Hyper-Raman-Spektren (Abb. 5.7 b) und die resonanten Raman-Spektren (Abb. 5.7 c) zwar grundsätzlich auch ähnlich, weisen aber mehr kleine Unterschiede auf. Beispielsweise ist das Intensitätsverhältnis der C=C- und C-C-Streckschwingungsbanden bei 1518 cm^{-1} und 1152 cm^{-1} in den Hyper-Raman-Spektren (Abb. 5.7 b) gegenüber den resonanten Raman-Spektren (Abb. 5.7 c) zugunsten der C=C-Bande verschoben. Die größere Ähnlichkeit der Spektren in Gegenwart der Silbernanopartikel deutet darauf hin, dass die Symmetrie der Carotinmoleküle bei Adsorption an die Silbernanopartikeloberfläche gestört wird, was die in den Spektren auftretenden Banden und deren relative Intensitäten maßgeblich beeinflusst.

In Experimenten von Shimada *et al.* mit kürzeren Anregungswellenlängen wurden dahingegen deutlich größere Unterschiede zwischen resonanten Raman- und Hyper-Raman-Spektren von β -Carotin beobachtet.^[188] Es ist also möglich, dass die Hyper-Raman-Spektren von Carotin stärker durch unterschiedliche Resonanz-Einflüsse verändert werden als die einphotonenangeregten Raman-Spektren. Für letztere wurden zwar in früheren Experimenten auch Unterschiede in einzelnen Banden beobachtet, abhängig davon, an welcher Position in der Absorptionsbande sich die Anregungswellenlänge befand,^[36] die spektrale Signatur änderte sich dabei jedoch weniger stark als für die Hyper-Raman-Spektren. Um dies näher zu untersuchen, müssten Anregungsprofile für die verschiedenen Banden in den Hyper-Raman- bzw. SEHRS-Spektren nicht nur auf der kurzwelligen Seite,^[188] sondern auch auf der langwelligen Seite der Absorptionsbande erstellt werden. Jedoch liefert auch der Vergleich der relativen Intensitäten in den SEHRS-, SERRS- und SERS-Spektren Ansatzpunkte für die unterschiedlichen Einflüsse des molekularen elektronischen Übergangs, wie im Folgenden gezeigt wird.

Die intensivsten Banden, vor allem in den SEHRS- und SERRS-Spektren, aber auch im SERS-Spektrum des Carotinthiols, sind die beiden Banden bei 1520 cm^{-1} und 1155 cm^{-1} (Abb. 5.10), die C=C- bzw. C-C-Streckschwingungen in der Mitte der Polyenkette zugeordnet werden können, dort wo sich die Molekülgeometrie beim Übergang zwischen den elektronischen Zuständen am meisten ändert, was zu großer Resonanzverstärkung führt.^[111] Dabei fällt auf, dass im nicht-resonant angeregten SERS-Spektrum die C-C-Schwingungsbande bei 1155 cm^{-1} intensiver ist (Abb. 5.10 a), während in den resonant angeregten SEHRS- und SERRS-Spektren die C=C-Schwingungsbande bei 1520 cm^{-1} intensiver ist (Abb. 5.10 b-c). Ein ähnliches Verhalten ist in den Spektren der Feststoffe beobachtbar (Abb. 5.7) und zeigt, dass die beiden Banden unterschiedlich stark durch Resonanzeffekte beeinflusst werden.

Im SEHRS-Spektrum ist das Intensitätsverhältnis der beiden resonant verstärkten Banden bei 1520 cm^{-1} und 1155 cm^{-1} zu den Banden bei 1591 cm^{-1} und 1178 cm^{-1} , die C=C- bzw. C-C-Streckschwingungen am Ende der Polyenkette repräsentieren und daher weniger Resonanz-Verstärkung erfahren, kleiner als im SERRS-Spektrum (vgl. Abb. 5.10 b und 5.10 c). In den Hyper-Raman- und Resonanz-Raman-Spektren des festen Carotinthiols ist dieses Intensitätsverhältnis jedoch gleich. Die Änderung der Intensitäten im SEHRS-Spektrum kann demnach auf einen Einfluss der Silbernanopartikel zurückgeführt werden, der bei Einphotonenanregung nicht auftritt. Die Oberflächenverstärkung für die Banden bei 1591 cm^{-1} und 1178 cm^{-1} kann im SEHRS-Spektrum größer sein als im SERRS-Spektrum, bedingt dadurch, dass der Einfluss von Metalloberfläche und Molekülanordnung bei Ein- und Zweiphotonenanregung unterschiedlich ist.^[10-12] Umgekehrt betrachtet ist es möglich, dass die Resonanzverstärkung für die Banden bei 1520 cm^{-1} und 1155 cm^{-1} bei SEHRS aufgrund einer elektronischen und/oder elektromagnetischen Kopplung zwischen den Silbernanopartikeln und den Molekülen abnimmt, wie für andere Molekülsorten bei SERRS theoretisch vorhergesagt und experimentell gezeigt wurde.^[31,32]

Das nicht-resonant angeregte SERS-Spektrum bestätigt dies (Abb. 5.10 a). Im SERS-Spektrum sind die Intensitätsverhältnisse zwischen den Banden bei 1591 cm^{-1} und 1520 cm^{-1} bzw. zwischen den Banden bei 1178 cm^{-1} und 1155 cm^{-1} im Vergleich zum SERRS-Spektrum (Abb. 5.10 c) noch weiter zugunsten der Schwingungen am Ende der Polyenkette verschoben als im SEHRS-Spektrum (Abb. 5.10 b). Da der Einfluss von Oberflächenauswahlregeln in den einphotonenangeregten Spektren unabhängig von der Anregungswellenlänge sein sollte, ist das geänderte Intensitätsverhältnis im nicht-

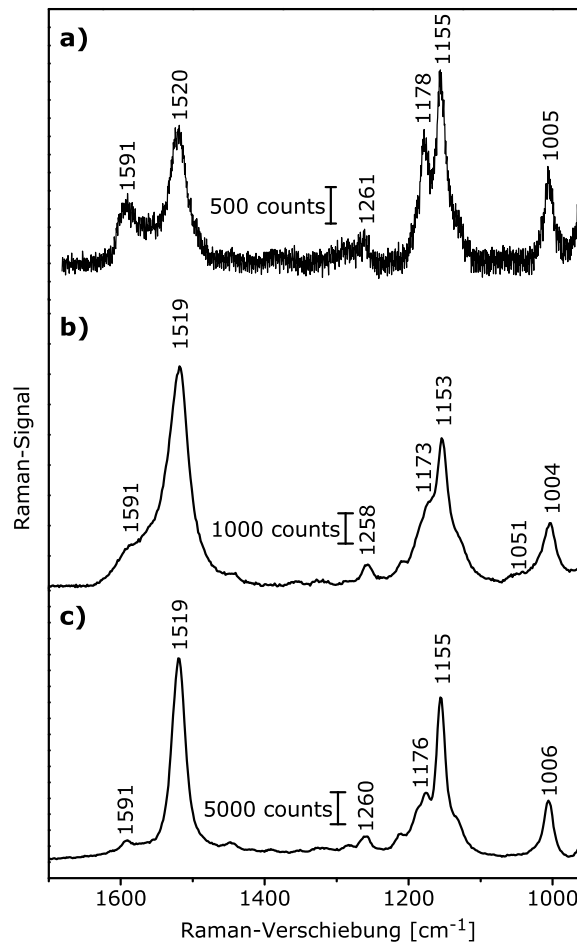


Abb. 5.10: (a) SERS-Spektrum, angeregt bei 1064 nm, von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), maximale Photonenflussdichte: $3 \cdot 10^{28} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 30 s. 100 Spektren von 5 verschiedenen Proben wurden basislinienkorrigiert und gemittelt. (b) SEHRS-Spektrum von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin wie in Abb. 5.6 a. (c) SERRS-Spektrum von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin wie in Abb. 5.6 b.

resonanten SERS-Spektrum ein eindeutiger Hinweis auf die Abwesenheit von Resonanzeffekten. Das ist insofern bemerkenswert, als dass die ebenfalls nicht-resonant angeregten Raman-Spektren der festen Carotine (Abb. 5.7 a) für die gleichen Banden beim Vergleich mit den Resonanz-Raman-Spektren der Feststoffe (Abb. 5.7 c) keinen Unterschied der Intensitätsverhältnisse aufweisen. Diese Ähnlichkeit kann durch einen Einfluss des molekularen elektronischen Übergangs auch auf die nicht-resonant angeregten Raman-Spektren erklärt werden, der anhand von Carotin und anderen Polyenen diskutiert und auf eine Kopplung zwischen Elektronen und Phononen im Festkörper zurückgeführt wurde.^[38,125]

Somit ermöglicht die Funktionalisierung von β -Carotin – aufgrund der stärkeren Wechselwirkung des Carotinthiols mit Silbernanopartikeln und der daraus folgenden größeren Oberflächenverstärkung – zum ersten Mal nicht-resonant angeregte SERS-Spektren eines β -Carotins in verdünnter wässriger Lösung und damit ohne Einfluss des elektronischen Übergangs. In Kombination mit den resonanten SEHRS-Spektren und SERRS-Spektren lassen sich daraus, wie in diesem und den vorangegangenen Abschnitten dieses Kapitels gezeigt wurde, umfangreiche strukturelle Informationen gewinnen. Sowohl die Einflüsse von Resonanz- und Oberflächenverstärkung als auch die Wechselwirkungen zwischen Carotin und den Silbernanopartikeln wurden untersucht. Die Kombination der verschiedenen Anregungsbedingungen ist insbesondere aufgrund der hohen Symmetrie von Carotin, die sehr unterschiedliche Auswahlregeln für Hyper-Raman- und Raman-Streuung bedingt, nützlich. Dies ist z. B. am Auftreten von infrarotaktiven Moden in den SEHRS-Spektren erkennbar. In Zukunft wäre eine Untersuchung der Abhängigkeit der resonanten SEHRS-Spektren von der Anregungswellenlänge interessant.

Kapitel 6

Bildgebende Experimente an mikrostrukturierten Oberflächen

In den Kapiteln 4-5 wurden SEHRS-Experimente diskutiert, bei denen einzelne chemische Verbindungen in homogenen Lösungen untersucht wurden. Diese Experimente sind wichtig für grundlegende Untersuchungen des Einflusses messtechnischer Parameter und chemischer Veränderungen in der Probe auf die Spektren sowie für die Charakterisierung der Hyper-Raman-Spektren verschiedener Verbindungen. Des weiteren lassen sich auf diese Weise Eigenschaften der plasmonischen Substrate bzw. Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Molekülen und den Metalloberflächen untersuchen.

Für weitergehende Anwendungen von SEHRS sollte jedoch auch die Analyse komplexer Proben, die Gemische verschiedener Verbindungen enthalten, ermöglicht werden. Um nicht nur die Zusammensetzung einer Probe, sondern auch die Verteilung der verschiedenen Bestandteile innerhalb der Probe zu ermitteln, ist eine orts aufgelöste Untersuchung erforderlich. Hierbei hat SEHRS-Mikroskopie den Vorteil, dass die spektrale Information aufgrund der für die Zweiphotonenanregung erforderlichen hohen Anregungsintensitäten und der quadratischen Abhängigkeit des Hyper-Raman-Signals von der Anregungsintensität aus einem extrem kleinen Fokusbereich von wenigen Femtolitern erhalten wird,^[6] was theoretisch eine sehr hohe Ortsauflösung ermöglicht. Allerdings ist aus dem gleichen Grund eine akkurate Fokussierung des Anregungslichts auf die Probe erforderlich, um überhaupt SEHRS-Spektren zu erhalten. Beim Abrastern einer flächigen Probe muss diese Fokussierung auf die plasmonischen Nanostrukturen dann auch durchgehend erhalten bleiben, was durch Höhenunterschiede der Probe oder allmähliches Eintrocknen bei Proben in einem flüssigen Medium erschwert werden

kann. Zudem erfordern die, im Vergleich zu anderen optischen Mikroskopie-Methoden, trotz plasmonischer Verstärkung relativ geringen Streuquerschnitte von SEHRS längere Akkumulationszeiten als z. B. bei SERS, sodass ein Kompromiss gefunden werden muss zwischen der Ortsauflösung, der Größe des untersuchten Probenausschnitts und der erforderlichen Messzeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Modellsysteme untersucht, die eine sehr einfache Mikrostruktur besitzen um grundsätzliche Untersuchungen hinsichtlich der Machbarkeit, sinnvoller Messparameter und der Algorithmen zur Spektrenauswertung für hyperspektrale SEHRS-Bildgebung durchzuführen. Als Grundlage für die meisten dieser Systeme wurden auf Glasoberflächen immobilisierte Silbernanopartikel verwendet, da sie als SERS-Substrate mit homogener Oberflächenverstärkung etabliert sind.^[68,69] Für die Mikrostrukturierung solcher Oberflächen wurden zwei verschiedene Ansätze untersucht:

1. die strukturierte Anordnung der Nanopartikel auf der Oberfläche mit Hilfe von Polystyren-Templaten.
2. die definierte Verteilung verschiedener Analyten auf gleichmäßig verteilten Silbernanopartikeln.

Für beide Ansätze wurden zunächst Untersuchungen mit einphotonenangeregten SERS-Spektren bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm durchgeführt, da für diese Anregungswellenlänge geeignete experimentelle Parameter für die immobilisierten Silbernanopartikel bekannt waren und somit eine grobe Evaluierung der Proben erfolgen konnte. Anschließend wurden die als sinnvoll erachteten Proben parallel mit SEHRS und SERS bei Anregung mit 1064 nm bzw. 532 nm untersucht. Als ein weiteres Templat für die Anordnung von Nanostrukturen wurden Zwiebelgewebe betrachtet.

Während anhand von definiert angeordneten Nanostrukturen ausschließlich die univariate Unterscheidung verschiedener Regionen anhand der Signalstärke untersucht werden kann, stellen die Systeme mit definierten Analytverteilungen komplexere Systeme dar. Die von diesen Systemen orts aufgelöst erhaltene hyperspektrale Information kann sowohl zur Charakterisierung der Analytverteilungen als auch zur Untersuchung verschiedener Wechselwirkungen der Moleküle mit der Silberoberfläche verwendet werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen im Einzelnen dargestellt.

6.1 Anordnung von Nanopartikeln mit Hilfe von Templaten

Die Oberflächenverstärkung in einem SERS-Experiment ist lokal stark begrenzt auf einen Bereich in einer Entfernung von bis zu wenigen Nanometern von der Oberfläche der plasmonischen Nanostruktur. Daher ist zu erwarten, dass sich auf einer Oberfläche, auf der Silbernanopartikel strukturiert in einem regelmäßigen Muster angeordnet sind, für die Intensität des SERS-Signals eines anschließend aufgetragenen Analyten ein mit der Nanopartikelanordnung vergleichbares Muster ergibt. Ein solches Muster stellt ein relativ einfaches Bildgebungsproblem dar, bei dem univariat zwischen unterschiedlichen Signalintensitäten unterschieden werden kann. Daher werden im Folgenden im Hinblick auf die Anwendung als Teststrukturen für bildgebende SEHRS-Experimente verschiedene Template für die Anordnung der Nanopartikel vorgestellt.

6.1.1 Polystyren-Template zur Anordnung von Nanopartikeln auf Glasoberflächen

Polystyrenmikrokugeln wurden in der Vergangenheit bereits verwendet, um ringförmige Anordnungen von CdSe-Quantenpunkten^[158] oder Goldnanopartikeln^[190] auf Glasoberflächen zu erzielen. Dabei wird ausgenutzt, dass sich die Polystyrenpartikel beim Trocknen einer Lösung, die diese Partikel enthält, in einem hexagonalen Muster nebeneinander anordnen und gleichzeitig in den Hohlräumen zwischen den mikrometergroßen Partikeln und der Glasoberfläche Kapillarkräfte entstehen, die auf die Nanopartikel wirken.^[158] Bei einer Anwendung der entstehenden Strukturen als SERS-Substrate sind die Nanopartikel auf der Oberfläche allerdings nicht ausreichend fixiert, um eine Beeinträchtigung der Strukturen beim Aufbringen von Analytlösungen zu umgehen. Daher wurde in dieser Arbeit ein veränderter Ansatz gewählt, bei dem Silbernanopartikel in Gegenwart von Polystyrenpartikeln auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) funktionalisierten Glasoberflächen immobilisiert wurden. Die Polystyrenpartikel wirken hierbei im wesentlichen als Platzhalter auf der Oberfläche. Zudem sollte die Entfernung der Polystyrenpartikel nicht mit Klebeband^[158,190] erfolgen, sondern durch Auflösen des Polystyrens in organischen Lösungsmitteln, um Einflüsse durch Rückstände des Klebebands auf die SERS-Spektren zu vermeiden. Als Lösungsmittel wurden Toluol, Aceton und Tetrahydrofuran getestet. Tetrahydrofuran zeigte einen deutlichen Einfluss auf die

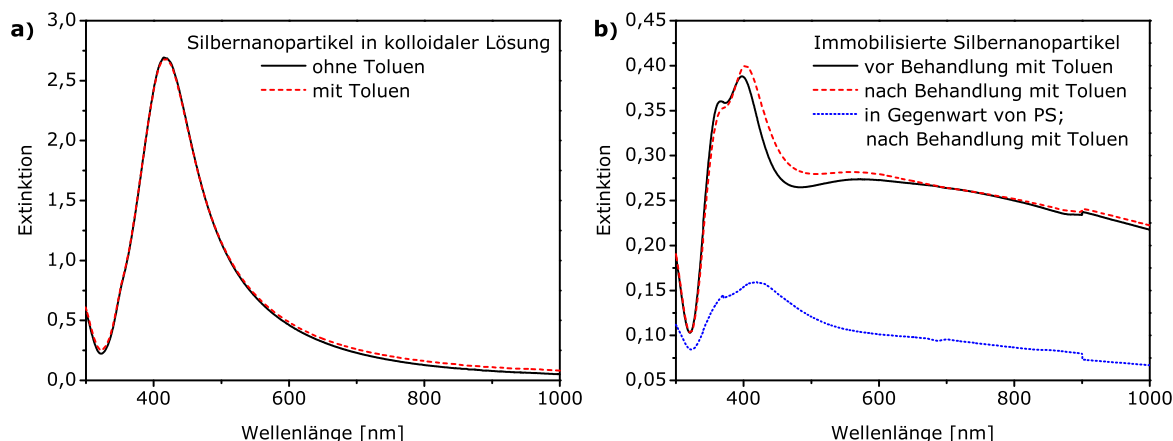


Abb. 6.1: Extinktionsspektren von (a) Silbernanopartikeln in kolloidaler Lösung, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurden, ohne und mit Zusatz von 10 % (v/v) Toluol und (b) immobilisierten Silbernanopartikeln vor und nach der Behandlung mit Toluol, sowie in Gegenwart von Polystyren (PS) immobilisierte Silbernanopartikel nach dem Auflösen des Polystyrens in Toluol.

optischen Eigenschaften sowohl der kolloidalen als auch der immobilisierten Silbernanopartikel. Die Ergebnisse in den SERS-Experimenten unterschieden sich nur wenig für die drei Lösungsmittel. Hier sind exemplarisch die Ergebnisse für Toluol dargestellt.

Zunächst wurde die Stabilität der Silbernanopartikel bei Einwirkung von Toluol untersucht. Der Vergleich der Extinktionsspektren von Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurden, und von den gleichen Silbernanopartikeln in Gegenwart von Toluol zeigt, dass sich die optischen Eigenschaften der Nanopartikel in kolloidaler Lösung durch den Einfluss des Toluols nicht ändern (Abb. 6.1 a). Werden diese Silbernanopartikel auf einer Glasoberfläche immobilisiert, zeigt die erweiterte Plasmonenbande, dass auf der Oberfläche auch Aggregate der Nanopartikel vorhanden sind (Abb. 6.1 b). Wird die Glasoberfläche mit den immobilisierten Nanopartikeln in Toluol getaucht, ergibt sich eine leichte Veränderung des Extinktionsspektrums (Abb. 6.1 b). Die Veränderung ist allerdings relativ gering und kann auch darauf zurückzuführen sein, dass die Position, an der die Probe bei der Extinktionsmessung durchstrahlt wird, nicht exakt festgelegt werden kann, und somit vor und nach der Toluol-Behandlung unterschiedliche Regionen der Probe untersucht wurden.

SERS-Untersuchungen der Oberflächen wurden mit Kristallviolett als Analyt durchgeführt. Kristallviolett hat einen relativ großen Raman-Streuquerschnitt, so dass ein Raman-Spektrum einer wässrigen Kristallviolettlösung bei höherer Konzentration unter den gleichen Anregungsbedingungen erhalten werden kann wie die SERS-Spektren. Damit besteht eine einfache Möglichkeit für die Quantifizierung des SERS-Signals.

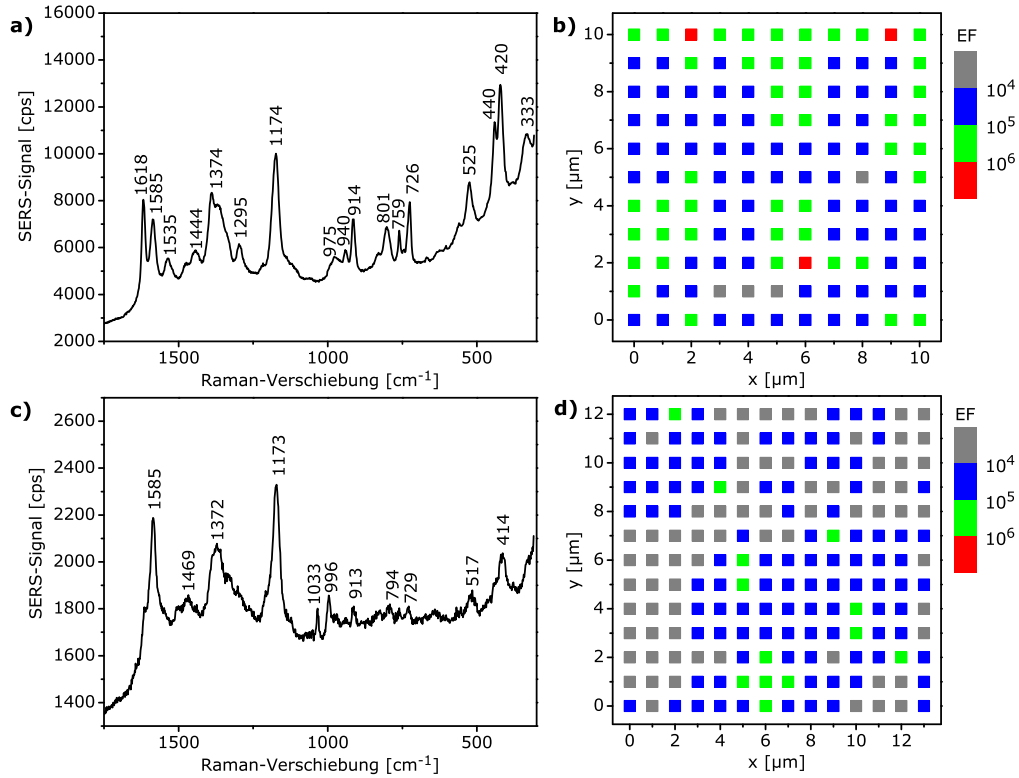


Abb. 6.2: (a) SERS-Spektrum von Kristallviolett (10^{-5} mol L $^{-1}$) auf immobilisierten Silbernanopartikeln, (b) lokale Verteilung der Verstärkungsfaktoren, bestimmt anhand der Bande von Kristallviolett bei 1174 cm^{-1} auf den immobilisierten Silbernanopartikeln, (c) SERS-Spektrum von Kristallviolett (10^{-5} mol L $^{-1}$) auf in Gegenwart von Polystyren-Mikropartikeln immobilisierten Silbernanopartikeln nach der Behandlung mit Toluol, (d) lokale Verteilung der Verstärkungsfaktoren auf derselben Probe wie in (c). Anregungswellenlänge: 785 nm , Photonenflussdichte: $3 \cdot 10^{24}$ Photonen $\text{cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 1 s .

Abb. 6.2 a zeigt ein exemplarisches SERS-Spektrum von Kristallviolett auf einer Oberfläche mit den immobilisierten Silbernanopartikeln ohne Polystyrentemplate und ohne Lösungsmiteleinfluss. Die anhand der C-H-Deformationsschwingungsbande von Kristallviolett bei 1174 cm^{-1} ermittelten Verstärkungsfaktoren zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung der SERS-Intensität auf dieser Oberfläche (Abb. 6.2 b). Wurde eine solche Oberfläche mit Toluol behandelt, ergaben sich ebenfalls Verstärkungsfaktoren in der Größenordnung von 10^4 - 10^5 in einer ähnlichen Verteilung wie ohne Toluoleinfluss, was darauf schließen lässt, dass das Toluol die Nanopartikel und ihre Anordnung tatsächlich nicht beeinträchtigt.

Werden die Silbernanopartikel in Gegenwart der Polystyrenpartikel immobilisiert, sind die Verstärkungsfaktoren im Mittel um einen Faktor von 5-10 geringer (Abb. 6.2 d),

was auf eine geringere Anzahl und/oder eine veränderte Anordnung der Nanopartikel auf der Oberfläche schließen lässt. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass die Extinktion einer solchen Oberfläche geringer und die Plasmonenbande etwas breiter ist als bei in Abwesenheit von Polystyrenpartikeln immobilisierten Silbernanopartikeln (Abb. 6.1 b). Es ist also anzunehmen, dass die Polystyrenpartikel tatsächlich einen Einfluss auf die Anordnung der Silbernanopartikel haben. Betrachtet man allerdings die lokale Verteilung der Verstärkungsfaktoren, so lässt sich kein regelmäßiges Muster erkennen (Abb. 6.2 d), das auf eine erfolgreiche, reproduzierbare Templatierung hindeuten würde. Außerdem konnte das Polystyren weder durch Toluol noch durch Aceton oder Tetrahydrofuran vollständig entfernt werden, wie am Auftreten von Ringdeformationsschwingungsbanden des Polystyrens^[191] bei 996 cm^{-1} und 1036 cm^{-1} in den SERS-Spektren zu erkennen ist (Abb. 6.2 c). Es ist zudem anzumerken, dass in einigen Regionen der Proben ausschließlich diese Polystyrenbanden, aber keine SERS-Signale von Kristallviolett beobachtet wurden, was darauf hindeutet, dass nach der Behandlung mit den organischen Lösungsmitteln noch große Mengen von Polystyren auf den Oberflächen verbleiben, obwohl alle verwendeten Lösungsmittel Polystyren grundsätzlich sehr gut und rückstandsfrei auflösen sollten. Eine ähnliche Problematik wurde im Rahmen dieser Arbeit auch mit photolithographisch strukturierten Proben beobachtet, bei denen nach der Funktionalisierung mit APTES für die Immobilisierung von Silbernanopartikeln das Auflösen des verwendeten Photolackes ebenfalls nicht mehr möglich war. Es ist daher davon auszugehen, dass APTES nicht nur an die Glasoberfläche und an die Silbernanopartikel bindet, sondern auch Polystyren und andere Polymere chemisch bindet oder verändert, sodass diese als Template bei der Immobilisierung von Silbernanopartikeln schlecht geeignet sind.

Die unregelmäßige lokale Verteilung der unterschiedlichen SERS-Verstärkungsfaktoren auf den templatierten Oberflächen (Abb. 6.2 d) kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann sie auf eine unregelmäßige Verteilung der Nanopartikel auf der Oberfläche hindeuten. Zum anderen zeigten auch die ohne Template immobilisierten Silbernanopartikel lokal leichte Unterschiede in der Verstärkung (Abb. 6.2 b). Da hier immer ein Mittelwert des SERS-Signals aller im Bereich des Laserfokus' adsorbierten Moleküle betrachtet wird, können solche feinen Unterschiede leicht zustandekommen, wenn an einem Punkt ein Silbernanoaggregat eine deutlich höhere Verstärkung liefert, sodass sich anhand des Verstärkungsfaktors nur bedingt eine Aussage über die Anzahl der Nanopartikel oder Nanoaggregate im Fokus treffen lässt. Dies kommt besonders

dann zum Tragen, wenn durch die Templatierung nicht ausschließlich Ringstrukturen in Abständen, die dem Durchmesser der Polystyrenpartikel von $3\text{ }\mu\text{m}$ entsprechen, gebildet werden, sondern auch in den Bereichen zwischen den Ringstrukturen Nanopartikel an der Glasoberfläche gebunden sind. Die Flächen innerhalb der Ringstrukturen, dort wo die Polystyrenpartikel die Glasoberfläche während der Immobilisierung bedecken, wären dann zwar noch immer frei von Nanopartikeln, jedoch sind diese Flächen zu klein, um mit der hier gegebenen Ortsauflösung von ihrer Umgebung eindeutig separiert zu werden: Unter Berücksichtigung einer idealen Kugelpackung^[158] wäre für die Ringstrukturen bei den hier verwendeten Partikeldurchmessern von $3\text{ }\mu\text{m}$ (Polystyren) und 42 nm (Silber) ein Innendurchmesser von 710 nm zu erwarten, während der minimale beugungsbegrenzte Durchmesser des Laserfokus' 800 nm beträgt und SERS-Spektren in einem Abstand von $1\text{ }\mu\text{m}$ gemessen wurden. Um die tatsächliche Anordnung von Silbernanopartikeln und Polystyren auf den Oberflächen zu untersuchen, könnten Elektronenmikroskopie-Untersuchungen durchgeführt werden. Da das Ziel hier jedoch in der Herstellung von Oberflächen mit einem nachvollziehbaren Muster der SERS-Verstärkung bestand, das mit dem hier vorgestellten Ansatz nicht erreicht wurde, wurde von weiteren Untersuchungen der Oberflächen abgesehen.

6.1.2 Pflanzengewebe als Templat für die Herstellung von Silbernanopartikeln

Eine weitere Möglichkeit der Templatierung besteht in der Ausnutzung der Mikrostrukturen von Pflanzenmaterialien.^[192] Dies soll im Folgenden am Beispiel von Zwiebelgewebe von *Allium cepa* gezeigt werden. Die Zwiebeln enthalten verschiedene chemische Verbindungen, u. a. Proteine^[193] und Ascorbinsäure^[194], die in der Lage sind, sowohl Edelmetallionen zu reduzieren als auch Nanopartikel zu stabilisieren. Daher können im Zwiebelgewebe *in situ* Silbernanostrukturen hergestellt werden. Diese Nanostrukturen bilden sich bevorzugt in den extrazellulären Bereichen, zwischen den Zellwänden, wie anhand von Dunkelfeldmikroskopieaufnahmen erkennbar ist (Abb. 6.3 a). Wird anschließend eine Lösung von Kristallviolett auf dem Zwiebelgewebe platziert, können SEHRS- und SERS-Spektren des Kristallvioletts erhalten werden (Abb. 6.3 b und 6.3 c, für die Zuordnung der Banden siehe Tabelle 6.1 auf S. 112).

Die ortsabhängige Untersuchung der Intensität der C-H-Deformationsschwingungsbande von Kristallviolett in den SEHRS-Spektren bei 1175 cm^{-1} zeigt, dass intensi-

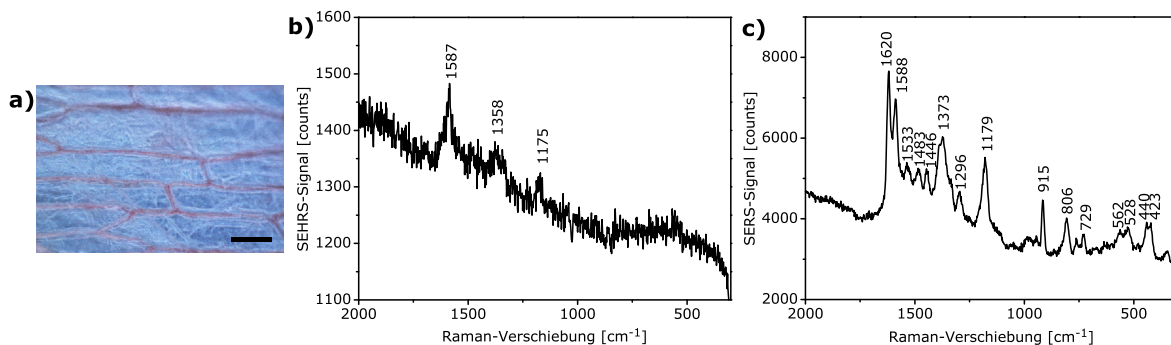


Abb. 6.3: (a) Dunkelfeldmikroskopiebild einer Zwiebelgewebeprobe mit *in situ* hergestellten Silbernanopartikeln, Skala: 100 μm ; Bild aufgenommen von Klaus Mogensen an der DTU Kopenhagen mit einem Eclipse LN200N Mikroskop (Nikon) bei 10facher Vergrößerung mit einer 50 W Halogenlampe, Manuskript zur Publikation eingereicht: M. Espina Palanco *et al.* 2016. (b) SEHRS-Spektrum und (c) SERS-Spektrum von Kristallviolett ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) auf einer Zwiebelgewebeprobe mit *in situ* hergestellten Silbernanopartikeln. Anregungsbedingungen: (b) 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $1 \cdot 10^{29} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 10 s; (c) 532 nm, maximale Photonenflussdichte: $5 \cdot 10^{25} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 2 s.

ve SEHRS-Signale nur in den Zellzwischenräumen und Zellwänden erhalten werden (Abb. 6.4 a), dort wo in Dunkelfeldmikroskopieaufnahmen die Silbernanostrukturen beobachtet wurden. Dies belegt, dass sich mit dem Zwiebelgewebe als Templat reproduzierbare, nachvollziehbare Mikrostrukturen für die SEHRS-Bildgebung konstruieren lassen. SERS-Signale von Kristallviolett wurden hingegen in den extrazellulären Regionen zwar in höherer Intensität erhalten, jedoch auch in den übrigen Regionen der Proben (Abb. 6.4 b). Es sind also vermutlich auch in diesen Regionen Nanostrukturen vorhanden, die aber scheinbar andere optische bzw. morphologische Eigenschaften aufweisen, sodass sie für SERS geeignet sind, für SEHRS aber nicht. Die geringere SERS-Verstärkung in diesen Regionen lässt vermuten, dass dort eher einzelne Nanopartikel vorliegen, während in extrazellulären Bereichen mehr Nanostrukturen vorliegen, die somit eher Aggregate bilden können. Die unterschiedlichen lokalen Verteilungen der SEHRS- und SERS-Intensitäten zeigt analog zu den Beobachtungen in Kapitel 4, dass SEHRS wesentlich selektiver bezüglich der Art der plasmonischen Nanostruktur ist.

Zusammengefasst sind Pflanzenmaterialien vielversprechende Template für die Anordnung von Silbernanostrukturen für bildgebende SEHRS-Experimente. Hier wurden keine intrinsischen Signale von Biomolekülen, die sich im Zwiebelgewebe befinden, erhalten. Prinzipiell wären aber, z. B. mit Geweben anderer Pflanzen, Anwendungen denkbar, bei denen auch einzelne Pflanzenbestandteile untersucht werden könnten, wenn diese Wechselwirkungen mit den Silbernanopartikeln eingehen.

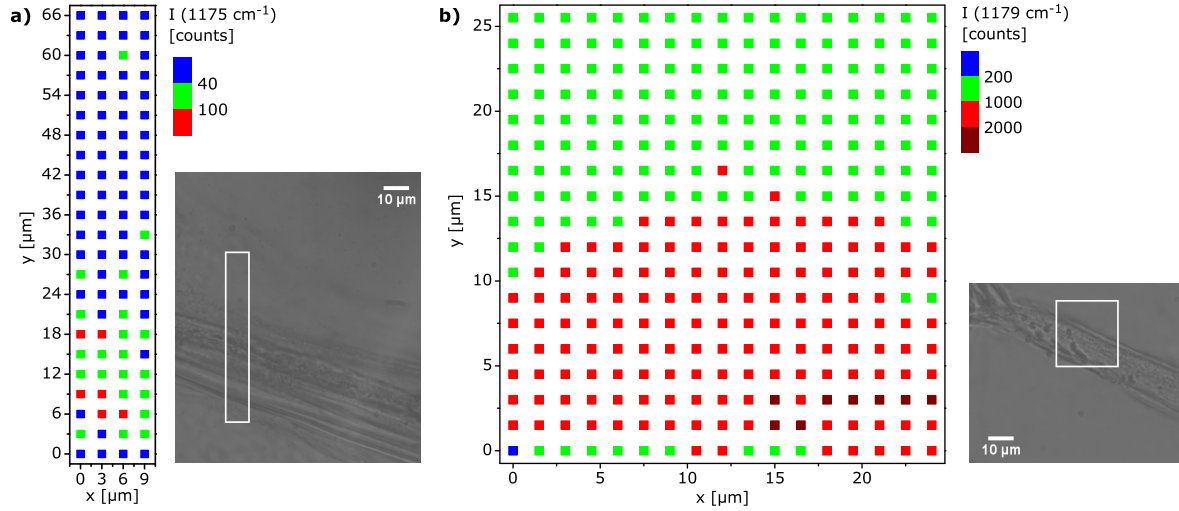


Abb. 6.4: Chemische Karten von Ausschnitten der Zwiebelgewebeprobe mit *in situ* hergestellten Silbernanostrukturen, basierend auf der Intensität der C-H-Deformationsschwingungsbande von Kristallviolett in den (a) SEHRS-Spektren bei 1175 cm⁻¹ und (b) SERS-Spektren bei 1179 cm⁻¹. Untersucht wurden die weiß umrandeten Bereiche in den Lichtmikroskopiebildern jeweils rechts neben den chemischen Karten. Als Untergrundintensität wurde die Intensität bei 1130 cm⁻¹ (SEHRS) bzw. 1150 cm⁻¹ (SERS) subtrahiert. In den SEHRS-Spektren entspricht eine Intensität von 40 counts der Intensität des Rauschens.

6.2 Strukturierte Verteilung von Analyten auf immobilisierten Silbernanopartikeln

Anstelle einer strukturierten Anordnung der Nanopartikel, wie in 6.1 beschrieben, kann eine Strukturierung auch durch Verteilung unterschiedlicher Analyten auf gleichmäßig verteilten Nanopartikeln erfolgen. Die zu trennenden Analyten in einem solchen Modellsystem sollten chemisch ähnlich sein, damit ihre Raman-Streuquerschnitte ähnlich sind und sie somit simultan detektiert werden können. Außerdem weisen chemisch ähnliche Moleküle auch qualitativ ähnliche Schwingungsspektren auf. Wenn diese unterschieden werden können, kann davon ausgegangen werden, dass das gewählte Auswertungsverfahren auch auf Spektren von Analyten mit größeren Unterschieden anwendbar ist. Das hier gewählte, möglichst schwierige Trennproblem dient demnach der Evaluierung der Auswertelgorithmen.

6.2.1 Aufbringen von Tropfen in einem Raster

Ein Ansatz für die Erstellung eines gleichmäßigen Rasters aus Flächen mit und ohne Analyten auf einer Oberfläche ist die Verwendung eines Spotters, der kleine Tropfen

fen von Analytlösungen in regelmäßigen Abständen auf der Oberfläche aufbringt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der definierten Struktur, die durch das automatisierte Aufbringen der Lösungen erzeugt wird, und in den kleinen Volumina der Lösungen, die eine schnelle und damit gleichmäßige Trocknung der Lösungen auf der Oberfläche ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines Kontaktpotters Lösungen von Adenin, Cytosin oder Kristallviolett auf Glasträger mit immobilisierten Silbernanopartikeln aufgebracht. Allerdings konnten in anschließenden Raman-Experimenten mit Anregung bei 785 nm nur in unregelmäßigen Abständen auf den Oberflächen Signale der Analyten detektiert werden. Zudem entstand der Eindruck, dass der mechanische Einfluss durch die Metallspitze des Spotters beim Aufbringen der Probelösungen zu groß ist und somit die Schicht aus immobilisierten Nanopartikeln auf der Glasoberfläche beeinträchtigt wird. Daher ist dieser Ansatz zur Verteilung der Analyten für diese Art von plasmonischen Substraten nicht geeignet und wurde nicht weiter verfolgt. In Zukunft könnte dieser Ansatz entweder durch eine stabilisierende Beschichtung der Substrate oder durch die Wahl einer anderen Technologie zum Aufbringen der Tropfen weiterentwickelt werden und damit eine praktische Anwendung möglich werden.

6.2.2 Immobilisierung von Nanopartikeln in Gegenwart von Analytlösungen

Organische Moleküle, die Heteroatome mit freien Elektronenpaaren, insbesondere Stickstoff und Schwefel, enthalten, haben eine große Affinität zu Silber und können daher stabil an Silbernanopartikeloberflächen adsorbieren.^[195] Werden kolloidalen Silbernanopartikeln vor der Immobilisierung auf funktionalisierten Glasträgern solche Analytmoleküle zugesetzt, kann man daher davon ausgehen, dass die Analytmoleküle gemeinsam mit den Nanopartikeln gleichmäßig auf der Glasoberfläche verteilt werden.

Im Folgenden werden Experimente beschrieben, bei denen durch sequentielle Immobilisierung von Silbernanopartikeln mit verschiedenen Analyten mehrere unterscheidbare Regionen auf einer Glasoberfläche erzeugt wurden. Die dadurch erzeugte Strukturierung ist relativ makroskopisch, jedoch hat diese Methode gegenüber dem in Abschnitt 6.2.1 beschriebenen Ansatz den Vorteil, dass prinzipiell an allen Orten der resultierenden Probe Analytmoleküle vorhanden sind. Die Unterscheidung der Regionen erfolgt hierbei anhand qualitativer Unterschiede in den Spektren und nicht über

6.2 Strukturierte Verteilung von Analyten auf immobilisierten Silbernanopartikeln

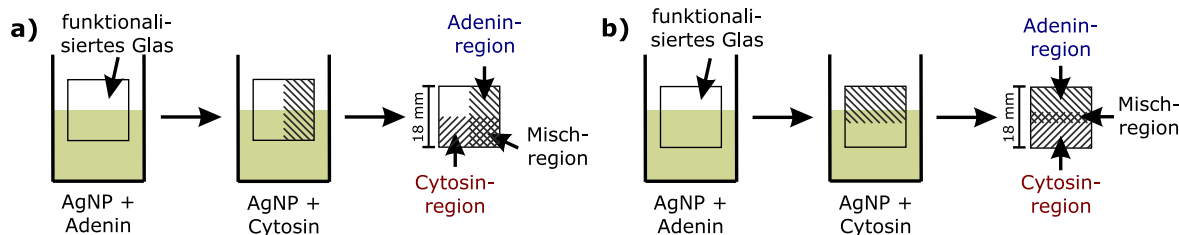


Abb. 6.5: Schematische Darstellung der Immobilisierung von Silbernanopartikeln auf Glasoberflächen in Gegenwart von Adenin bzw. Cytosin zur Bildung von mikrostrukturierten Oberflächen. (a) Drehung des Glasplättchens um 90° zwischen den Immobilisierungsschritten, (b) Drehung um 180°.

eine Unterscheidung zwischen vorhandenem und nicht vorhandenem Signal wie es bei der Strukturierung in Abschnitt 6.1 der Fall ist.

Es wurden für diese Experimente Silbernanopartikel verwendet, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden, da diese eine verlässlich hohe SERS-Verstärkung liefern. Als Analytmoleküle wurden die beiden Nukleobasen Adenin und Cytosin gewählt, da deren SERS-Spektren gut bekannt sind.^[196,197] Zudem ist die Untersuchung dieser beiden Analyten, die als Bestandteile von Nukleinsäuren in der Natur weit verbreitet sind, im Modellsystem relevant für potentielle spätere Fragestellungen hinsichtlich realer Proben.

Die Vorgehensweise zur Herstellung der strukturierten Proben ist in Abb. 6.5 schematisch gezeigt. Ein Glasplättchen wird mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) funktionalisiert und anschließend zuerst etwa zur Hälfte in eine Lösung mit Silbernanopartikeln und Adenin getaucht und danach um 90° (Abb. 6.5 a) oder 180° (Abb. 6.5 b) gedreht und wieder etwa zur Hälfte in eine Lösung mit Silbernanopartikeln und Cytosin getaucht. Dadurch entstehen jeweils drei Regionen: Eine Region, in der sich nur Adenin befindet, eine Region, in der sich nur Cytosin befindet, sowie eine Region, die nacheinander in Lösungen beider Analyten getaucht wurde und im Folgenden als Mischregion bezeichnet wird. Eine Drehung des Glasplättchens um 90° zwischen den beiden Immobilisierungsschritten ergibt eine größere und gleichmäßigere Mischregion als eine Drehung um 180°, bei der die Mischregion sich in beiden Immobilisierungsschritten nah an der Oberfläche der Lösung befindet, wo durch die Bewegung beim Eintauchen und beim Rühren der Lösung eine durchgehende Benetzung des Glasplättchens nicht gewährleistet werden kann.

Die Konzentration der Analyten in den für die Immobilisierung verwendeten Lösungen wurde so gewählt, dass eine analytinduzierte Aggregation der Nanopartikel weitestgehend ausgeschlossen werden kann und die Nanopartikeloberflächen nicht vollständig

bedeckt sind. Der mittlere Durchmesser der hier verwendeten Silbernanopartikel beträgt (128 ± 36) nm, die Nanopartikelkonzentration ist $2 \cdot 10^{-11}$ mol L⁻¹. Bei der verwendeten Konzentration von Adenin von $9 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹ und unter Berücksichtigung des Platzbedarfs eines Adeninmoleküls auf einer Goldoberfläche von $0,42$ nm²^[198] ergibt sich daraus ein Bedeckungsgrad der Silbernanopartikeloberfläche von 5 %. Der Platzbedarf von Cytosin ist nicht exakt bekannt, jedoch ist der Platzbedarf von Thymin, das ebenfalls eine Pyrimidinbase und somit dem Cytosin ähnlich ist, $0,41$ nm²^[198]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Bedeckungsgrad mit Cytosin in der gleichen Größenordnung liegt wie der mit Adenin. Bei einer Bedeckung von 5 % ist noch ausreichend freie Silberoberfläche vorhanden um zum einen die Bindung an die APTES-Moleküle auf der funktionalisierten Glasoberfläche und zum anderen die Beobachtung einer zusätzlichen Referenzsubstanz (siehe Abb. 6.9 und Abb. 6.10) zu ermöglichen.

Vor der Untersuchung der strukturierten Proben wurde zunächst die Unterscheidbarkeit der beiden Nukleobasen anhand der SERS-Spektren ihrer Lösungen auf immobilisierten Silbernanopartikeln analysiert (Abb. 6.6). Die Banden in den SERS-Spektren entsprechen den in der Literatur bekannten Banden von Adenin^[196] (Abb. 6.6 a) bzw. Cytosin^[197] (Abb. 6.6 c), mit Ausnahme der Banden bei ca. 930 cm⁻¹, 950 cm⁻¹ und 1030 cm⁻¹, die dem auf der Oberfläche der Nanopartikel vorhandenen Citrat zugeordnet werden können,^[199] und zweier Schultern in den Spektren von Cytosin bei 837 und 735 cm⁻¹, deren Herkunft nicht geklärt werden konnte. Charakteristische, intensive Banden, die verlässlich in den SERS-Spektren der beiden Nukleobasen auftreten, sind diejenigen der Ringatemschwingungen bei 735 cm⁻¹ in den Spektren von Adenin (Abb. 6.6 a) und bei 798 cm⁻¹ in den Spektren von Cytosin (Abb. 6.6 c). Beide Banden haben in den SERS-Spektren einer äquimolaren Mischung der beiden Analyten ungefähr die gleiche Intensität (Abb. 6.6 b); die statistische Auswertung aller vorliegenden SERS-Spektren der Mischung ergibt ein Verhältnis der Intensität der Adeninbande zur Intensität der Cytosinbande von $1,2 \pm 0,5$ (siehe auch die Verteilung der Werte in Abb. 6.6 e). Dahingegen ist in den Spektren von nur einem der beiden Analyten jeweils eine der beiden Banden dominant. In den Spektren von Adenin ist die Bande bei 798 cm⁻¹ praktisch nicht vorhanden, was bei der Auswertung der basislinienkorrigierten Intensitäten größtenteils zu sehr großen oder negativen Intensitätsverhältnissen führt. In 27,5 % der Adeninspektren ist die Intensität bei 798 cm⁻¹ nach Subtraktion der Untergrundintensität kleiner oder gleich Null, in 72,1 % der Spektren ist diese Intensität geringer als die der Adeninbande bei 735 cm⁻¹ und nur in 0,4 % der Spek-

6.2 Strukturierte Verteilung von Analyten auf immobilisierten Silbernanopartikeln

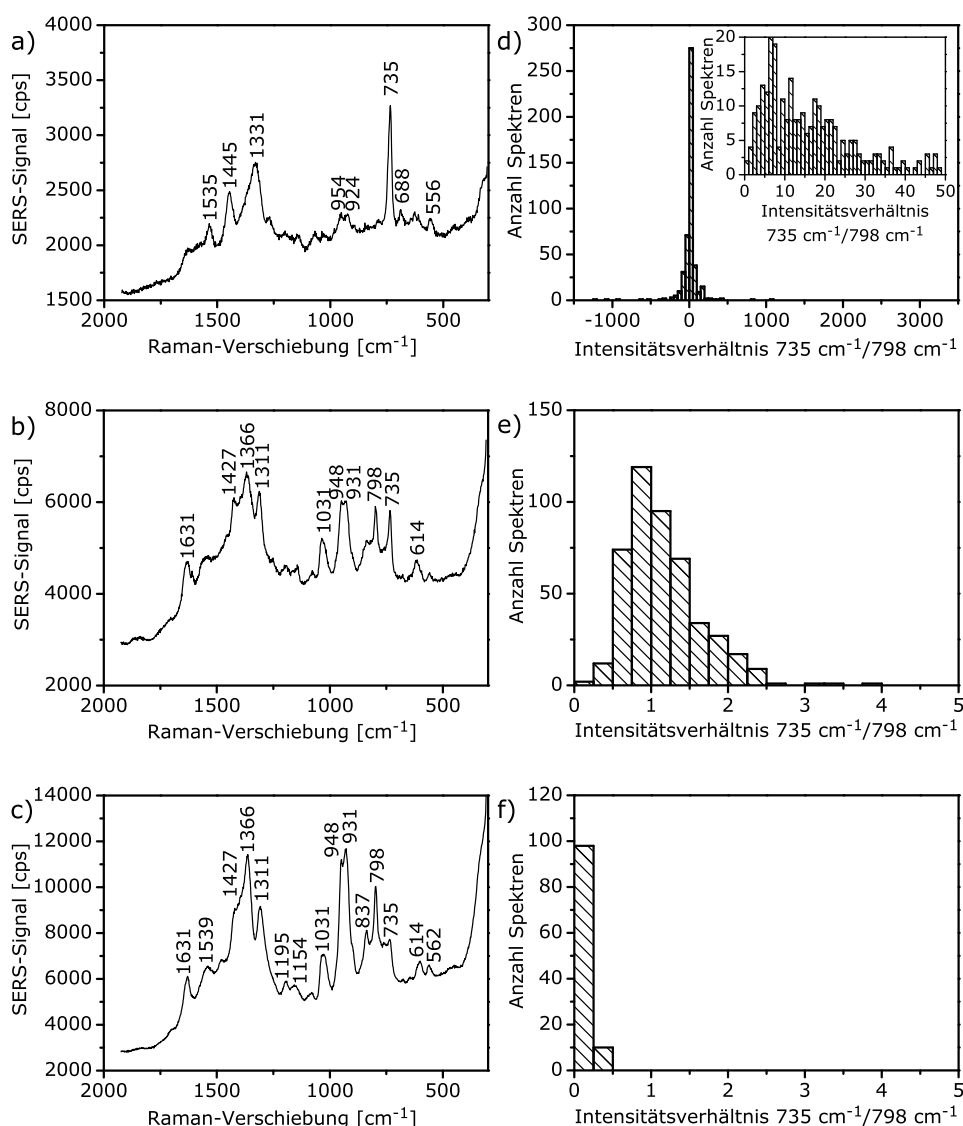


Abb. 6.6: (a-c) Exemplarische SERS-Spektren von Lösungen von (a) Adenin, (b) einer 1:1-Mischung von Adenin und Cytosin und (c) Cytosin auf immobilisierten Silbernanopartikeln. (d-f) Statistische Auswertung des Intensitätsverhältnisses der Ringatemschwingungsbanden bei 735 cm⁻¹ und 798 cm⁻¹ für die Spektren von (d) Adenin, (e) der Mischung und (f) Cytosin. Konzentration der Analyten 10⁻⁶ mol L⁻¹. Anregungswellenlänge 785 nm, Photonenflussdichte: 3·10²⁴ Photonen cm⁻² s⁻¹, Integrationszeit: 1 s. Zur Ermittlung der Intensitäten der beiden Banden wurde die Intensität bei 765 cm⁻¹ als Untergrund subtrahiert, dadurch ergeben sich für die Adeninspektren teilweise negative Intensitätsverhältnisse, wenn an der Position der nicht vorhandenen Cytosinbande der Untergrund niedriger ist.

tren ist die Bande bei 798 cm⁻¹ intensiver (siehe auch Abb. 6.6 d). In den Spektren von Cytosin ist zwar eine Schulter bei 735 cm⁻¹ (der Raman-Verschiebung der Adeninringatemschwingung) vorhanden, diese ist aber in allen Spektren deutlich weniger

intensiv als die Ringatemschwingungsbande von Cytosin bei 798 cm^{-1} (Abb. 6.6 f). Das Intensitätsverhältnis der Ringatemschwingungsbanden ermöglicht somit eine univariante Unterscheidung von Adenin und Cytosin anhand der SERS-Spektren.

Bei einer strukturierten Probe, die nach Abb. 6.5 a hergestellt wurde, wurden zunächst die drei einzelnen Regionen (Adenin-, Cytosin- und Mischregion) untersucht, indem in Ausschnitten der jeweiligen Region orts aufgelöst SERS-Spektren gemessen wurden (Abb. 6.7). Die Spektren aus den drei Regionen (Abb. 6.7 a) sind vergleichbar mit den Spektren der Analytlösungen (Abb. 6.6 a-c). Dies belegt, dass bei der Immobilisierung der Nanopartikel aus den Nanopartikel-Analyt-Gemischen tatsächlich sowohl Nanopartikel als auch Analytmoleküle auf der Glasoberfläche aufgebracht werden. Analog zur Auswertung der Spektren der Analytlösungen (Abb. 6.6 d-f) können für die Spektren der verschiedenen Regionen auf der strukturierten Probe die Intensitätsverhältnisse der Ringatemschwingungsbanden der beiden Nukleobasen statistisch ausgewertet werden. Die ortsabhängige Auftragung der Intensitätsverhältnisse gibt Aufschlüsse über die Verteilung der Analyten auf der Oberfläche, was eine Beurteilung der Gleichmäßigkeit der Verteilung ermöglicht.

Für die Adeninregion hat das Verhältnis der Intensität der Adeninbande (735 cm^{-1}) zu der der Cytosinbande (798 cm^{-1}) in der Mehrzahl der Spektren entweder einen negativen Wert oder einen Wert, der deutlich oberhalb von 1 liegt. Beides deutet darauf hin, dass in den entsprechenden Spektren bei 798 cm^{-1} keine oder eine sehr schwache Bande vorhanden ist, während die Adeninbande bei 735 cm^{-1} vergleichsweise intensiv ist. Die dunkelblauen und grauen Pixel in Abb. 6.7 b repräsentieren somit, trotz unterschiedlicher Werte für das Intensitätsverhältnis, in Bezug auf die Ringatemschwingungsbanden ähnliche Spektren, deren Unterscheidung hauptsächlich auf Variationen in der Intensität des Untergrundes beruht, die sich bei Abwesenheit der Bande bei 798 cm^{-1} auf das Vorzeichen der basislinienkorrigierten Intensität dieser Bande und damit auch auf das Vorzeichen des Intensitätsverhältnisses auswirkt. Die Adeninregion enthält demnach wie erwartet hauptsächlich Adenin.

In der Mischregion ist die örtliche Verteilung von Spektren mit intensiverer Adeninbande und solchen mit intensiverer Cytosinbande gleichmäßig (Abb. 6.7 c). Die Auswertung der Spektren aus allen untersuchten Ausschnitten dieser Region ergibt auch bezüglich der Anzahl der Spektren eine gleichmäßige Verteilung: 52,4 % der Spektren haben eine intensivere Adeninbande, 46,6 % haben eine intensivere Cytosinbande und bei 11,0 % der Spektren ist das Intensitätsverhältnis der beiden Banden genau 1. Dar-

6.2 Strukturierte Verteilung von Analyten auf immobilisierten Silbernanopartikeln

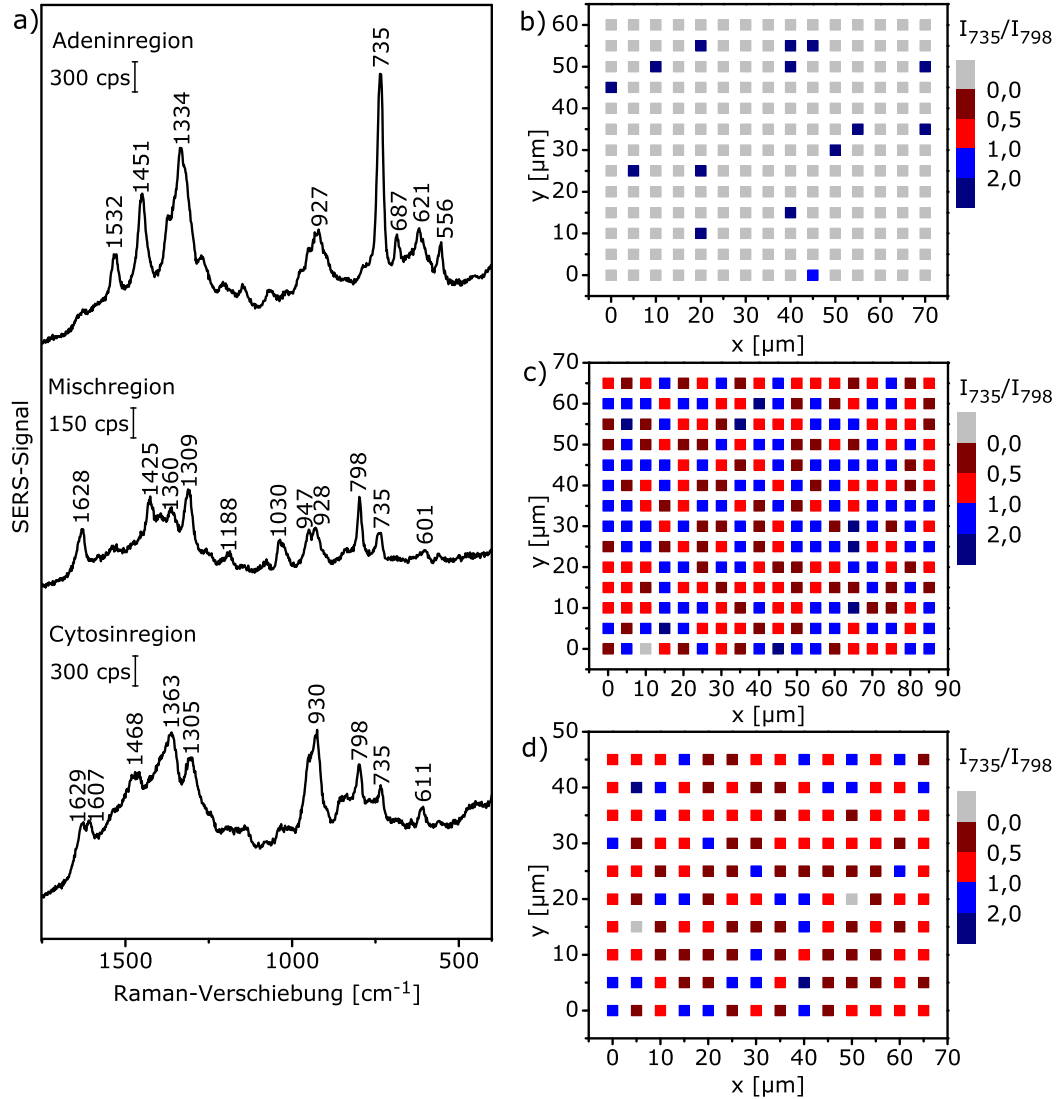


Abb. 6.7: (a) Exemplarische SERS-Spektren aus den drei verschiedenen Regionen einer Oberfläche, die nach Abb. 6.5 a hergestellt wurde, Anregungswellenlänge: 785 nm, Photonenflussdichte: $3 \cdot 10^{24}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, 1 s. (b-d) Verteilung des Intensitätsverhältnisses der Ringatemschwingungsbanden von Adenin (I_{735}) und Cytosin (I_{798}) in den SERS-Spektren innerhalb von Ausschnitten (b) der Adeninregion, (c) der Mischregion und (d) der Cytosinregion. $I_{735}/I_{798} < 1$: Cytosinüberschuss; $I_{735}/I_{798} > 1$: Adeninüberschuss; $I_{735}/I_{798} < 0$: in der Adeninregion: Cytosinbande nicht vorhanden, in der Cytosinregion: Adeninbande nicht vorhanden.

aus lässt sich schließen, dass die beiden Analyten gleichmäßig auf der Oberfläche der Mischregion verteilt sind, obwohl sie nacheinander aufgebracht wurden. Dies kann zum einen darauf hindeuten, dass im ersten Immobilisierungsschritt nicht alle verfügbaren Bindungsstellen an der Glasoberfläche durch Nanopartikel mit Adenin besetzt wurden, so dass für die Bindung von Nanopartikeln mit Cytosin im zweiten Schritt noch Plätze

verfügbar waren. Zum anderen ist es möglich, dass während des zweiten Immobilisierungsschrittes in der Lösung ein Austausch von Analyten an den Nanopartikeloberflächen oder auch von Nanopartikeln mit adsorbierten Analyten an der Glasoberfläche stattgefunden hat.

Ein Austausch von entweder Nanopartikeln oder Analyten während des Eintauchens des Glasplättchens in die zweite Lösung ist wahrscheinlich und wird auch durch die beobachteten Intensitätsverhältnisse in den Spektren der Cytosinregion bestätigt (Abb. 6.7 d). Nach Betrachtung der SERS-Spektren einer Cytosinlösung auf immobilisierten Nanopartikeln (Abb. 6.6 f) wäre zu erwarten, dass auch in der Cytosinregion der strukturierten Probe die Adeninbande bei 735 cm^{-1} immer schwächer ist als die Cytosinbande bei 798 cm^{-1} , womit sich ein Intensitätsverhältnis deutlich unterhalb von 1 ergäbe. In 28,7 % der Spektren aus der Cytosinregion ist allerdings die Adeninbande geringfügig intensiver und in 1,0 % der Spektren haben beide Banden die gleiche Intensität (die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Spektren aus dem in Abb. 6.7 d gezeigten sowie zwei weiteren Ausschnitten). Es müssen also kleine Mengen von Adenin während des zweiten Immobilisierungsschrittes in der Mischregion desorbiert und durch die Lösung in die Cytosinregion transportiert worden sein. Im Vergleich zur Mischregion ist der Anteil der Spektren mit einem Intensitätsverhältnis oberhalb von 1 in der Cytosinregion aber deutlich geringer und es gibt weniger Spektren mit Intensitätsverhältnissen oberhalb von 2, die auf einen stärkeren Adeninüberschuss hindeuten würden. Eine Unterscheidung von Misch- und Cytosinregion ist also anhand der Intensitätsverhältnisse in den SERS-Spektren möglich und es ist davon auszugehen, dass trotz partiellen Austausches der Analyten der Anteil von Adenin in der Mischregion höher ist als in der Cytosinregion.

Sowohl die Adeninregion als auch die Cytosinregion haben jeweils eine Grenze zur Mischregion. Aufgrund der einfachen Präparationsmethode ist die Grenze zwischen zwei Regionen mikroskopisch nicht eindeutig definiert. Allerdings ist - dadurch dass auf einem Teil der Probe keine Nanopartikel immobilisiert sind, weil dieser Teil in keine der Lösungen eingetaucht wurde (siehe auch Abb. 6.5 a) - eine grobe Orientierung anhand der Färbung der Probe möglich, da immobilisierte Silbernanopartikel eine grau-gelbe Färbung der Probe verursachen. Teilweise lässt sich in diesem Bereich auch lichtmikroskopisch eine Trennlinie beobachten (Abb. 6.8 a). Die Intensitätsverhältnisse der Ringatemschwingungsbanden der beiden Analyten in den SERS-Spektren (Abb. 6.8 c) aus dem in Abb. 6.8 a gekennzeichneten Ausschnitt zeigen einen Übergang von einer

6.2 Strukturierte Verteilung von Analyten auf immobilisierten Silbernanopartikeln

Region mit deutlichem Cytosinüberschuss zu einer gemischten Region, in dem auch Stellen vorkommen, an denen mehr Adenin vorhanden ist (Abb. 6.8 b). Dies stimmt mit der erwarteten Verteilung der beiden Analyten in Folge der Probenpräparation überein.

An dieser Stelle sollte berücksichtigt werden, dass Abb. 6.8 nur ein kleiner Ausschnitt der Grenze zwischen zwei Regionen einer Probe ist. Aufgrund der Diffusions- und Austauschprozesse während der sequentiellen Immobilisierungsschritte treten solche ideal trennbaren Bereiche nicht überall in den Grenzregionen auf bzw. der Übergang von einer Region zur nächsten erstreckt sich über eine größere Distanz als die hier untersuchte (siehe auch Abschnitt 6.4). Dennoch zeigt Abb. 6.8 das große Potential der SERS-Mikroskopie für die orts aufgelöste Untersuchung der Verteilung verschiedener Analyten auf einem flächigen plasmonischen Substrat. Zudem lässt sich an den hier gezeigten Untersuchungen die grundsätzliche Eignung der hier verwendeten, einfach

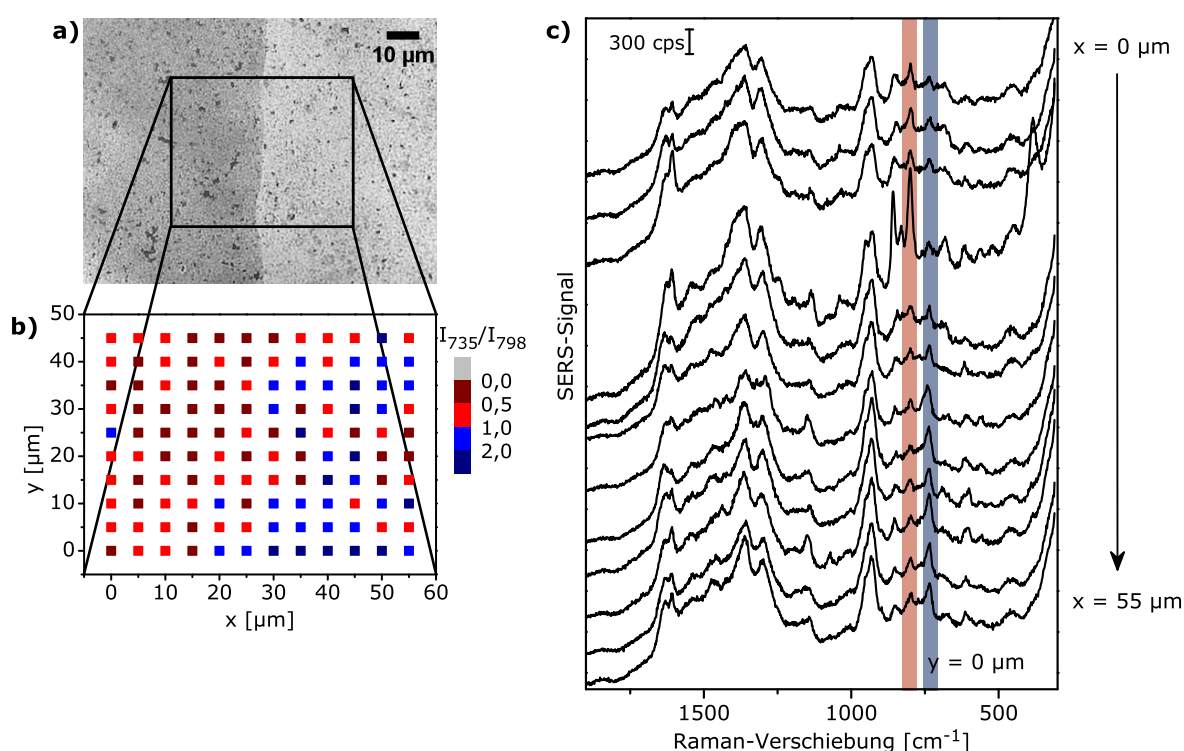


Abb. 6.8: (a) Lichtmikroskopiebild eines Ausschnitts der Grenzregion zwischen Cytosinregion (links) und Mischregion (rechts) einer nach Abb. 6.5 hergestellten Probe. (b) Intensitätsverhältnis der Ringatemschwingungsbanden von Adenin und Cytosin in den SERS-Spektren in dem in (a) markierten Ausschnitt. (c) SERS-Spektren der Pixel in der untersten Zeile der chemischen Karte in (b), die in (b) untersuchten Banden sind farbig hinterlegt, Anregungswellenlänge: 785 nm, Photonenflussdichte: $3 \cdot 10^{24} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 1 s.

herstellbaren Proben für die angestrebte Charakterisierung der SEHRS-Mikroskopie erkennen.

Teilweise wurde in den Grenzregionen der strukturierten Proben (insbesondere bei denjenigen, die nach Abb. 6.5 b hergestellt wurden) beobachtet, dass die SERS-Spektren eine schlechtere Qualität (geringeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis, geringere Intensität der Banden) aufweisen als in Regionen der Proben, die weiter von der Grenze entfernt sind. Grund dafür kann zum einen eine geringere Anzahl an Analytmolekülen, zum anderen eine veränderte Anordnung oder geringere Anzahl der Nanopartikel auf der Oberfläche sein. Letzteres würde insgesamt zu einem geringeren Verstärkungsfaktor an den betroffenen Probenstellen führen, was sich mit Hilfe einer zusätzlichen Referenzsubstanz feststellen lässt. Als Referenz wird hier Kristallviolett verwendet. Die SERS-Spektren einer gemischten Lösung aus Adenin, Cytosin und Kristallviolett (alle $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) auf immobilisierten Silbernanopartikeln zeigen zusätzlich zu den Banden von Adenin und Cytosin Banden von Kristallviolett (Abb. 6.9). Aus der Intensität der C-H-Deformationsschwingungsbande von Kristallviolett bei 1175 cm^{-1} wurden mit einem normalen Raman-Spektrum von Kristallviolett als Referenz Verstärkungsfaktoren bestimmt. Es wurde diese Bande von Kristallviolett verwendet, da sie verlässlich in allen Spektren (auch in den Raman-Referenzspektren) auftritt und in einem Spektralbereich liegt, in dem die Spektren der Nukleobasen nur sehr schwache Banden aufweisen (siehe auch Abb. 6.6 und 6.7). Die Verstärkungsfaktoren, die aus den SERS-Spektren der gemischten Lösung ermittelt wurden, liegen mit 10^5 bis 10^6 in der gleichen Größenordnung wie der Verstärkungsfaktor, der mit einer reinen Kristallviolettlösung für die gleiche Oberfläche bestimmt wurde. Die simultane Detektion von Kristallviolett neben Adenin und Cytosin wird bei der verwendeten Konzentration somit nicht durch die Konkurrenz auf der Silberoberfläche beeinträchtigt.

Auch in den SERS-Spektren von immobilisierten Nanopartikeln, denen während der Immobilisierung bereits Adenin bzw. Cytosin zugegeben wurde, lassen sich bei Zugabe von Kristallviolettlösung während der Messung zusätzlich Banden von Kristallviolett beobachten (Abb. 6.10 a). Somit können auch für eine solche Oberfläche Verstärkungsfaktoren ermittelt werden. Dabei ist zu beachten, dass die C-H-Deformationsschwingungsbande von Kristallviolett sich in den Spektren der strukturierten Oberflächen nicht an einer konstanten Position befindet, sondern sich in einem Bereich zwischen 1175 cm^{-1} und 1190 cm^{-1} verschiebt (in Abb. 6.10 grün markiert), was auf eine variable Adsorptionsgeometrie der Kristallviolettmoleküle auf der strukturierten

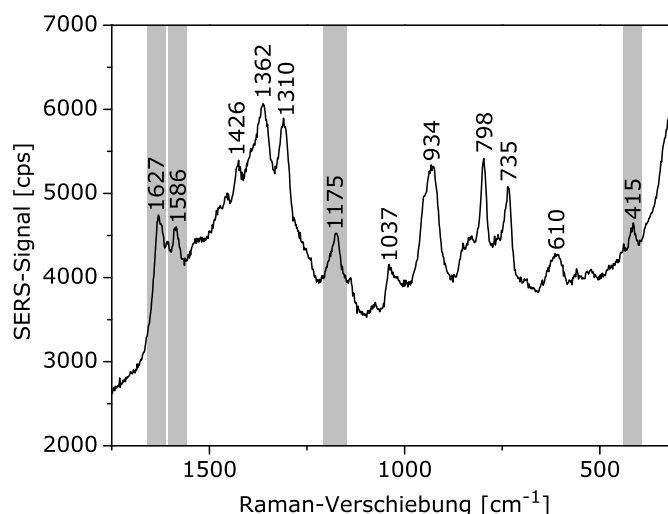


Abb. 6.9: SERS-Spektrum einer gemischten Lösung aus Adenin, Cytosin und Kristallviolett (alle $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) auf immobilisierten Silbernanopartikeln, Anregungswellenlänge: 785 nm, Photonenflussdichte: $3 \cdot 10^{24} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 1 s. Die Banden, die durch Kristallviolett zusätzlich auftreten, sind grau hinterlegt.

Oberfläche hindeuten kann. Trägt man die Verstärkungsfaktoren, die aus den SERS-Spektren einer strukturierten Probe mit zusätzlicher Kristallviolettlösung bestimmt wurden, ortsabhängig auf, zeigt sich für die beiden diskreten Regionen der Probe eine mikroskopische Homogenität der Verstärkung (Abb. 6.10 c-d), wie sie auch in [69] für immobilisierte Nanopartikel ohne weitere Analyten beschrieben ist. Das Auftreten der Kristallviolettbanden mit gleichmäßiger Intensität neben den Banden von Adenin und Cytosin zeigt, dass nach der Präparation der strukturierten Proben noch nicht die gesamte verfügbare Silberoberfläche besetzt ist, sodass die Kristallviolettmoleküle zusätzlich adsorbieren können. Außerdem belegen die Banden der nachträglich zugegebenen Kristallviolettlösung und die in ihrer Größenordnung mit denen einer Probe ohne Nukleobasen-Strukturierung vergleichbaren Verstärkungsfaktoren, dass die Gegenwart von Analytmolekülen die Immobilisierung der Silbernanopartikel grundsätzlich nicht beeinträchtigt.

Bei der Untersuchung der Grenzregion lassen sich jedoch Einschränkungen erkennen. Bei strukturierten Proben nach Abb. 6.5 b befindet sich die Grenzregion in beiden Immobilisierungsschritten in der Nähe der Oberfläche der Lösung, in die die Probe eingetaucht wird. Die Bewegung der Flüssigkeit durch Rühren während der Immobilisierung kann dazu führen, dass die Benetzung der Glasoberfläche nicht durchgehend gegeben ist, so dass in dieser Region weniger Nanopartikel und/oder Analyten ge-

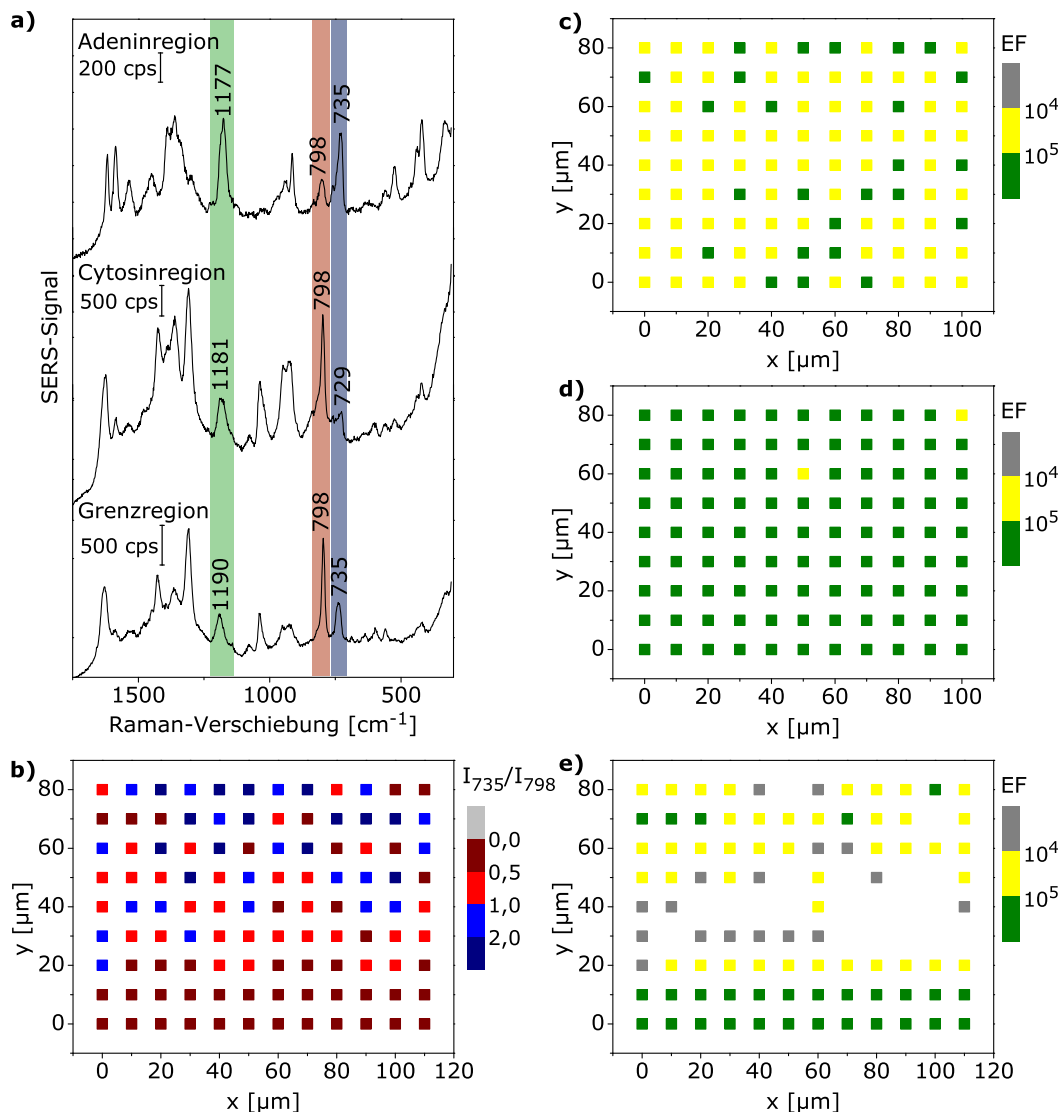


Abb. 6.10: (a) Exemplarische SERS-Spektren aus der Adeninregion, Cytosinregion und Grenzregion (von oben nach unten) einer nach Abb. 6.5 b hergestellten Probe nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Kristallviolett-Lösung, Anregungswellenlänge: 785 nm, Photonenflussdichte: $3 \cdot 10^{24} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 1 s. (b) Verteilung des Intensitätsverhältnisses der Ringatemschwingungsbanden von Adenin und Cytosin in den SERS-Spektren in einem Ausschnitt der Grenze zwischen Cytosinregion und gemischter Grenzregion. (c-d) Verteilung des Verstärkungsfaktors in Ausschnitten der Adenin- (c) und der Cytosinregion (d). (e) Verteilung des Verstärkungsfaktors in demselben Ausschnitt der Grenze wie in (b). Spektren an den weißen Punkten in (e) weisen nur Adenin- und Cytosinbanden auf, aber keine CV-Banden.

bunden werden, was sich in geringeren Intensitäten der SERS-Spektren widerspiegelt. Während jedoch Banden von Adenin und/oder Cytosin - in unterschiedlicher Intensität - in allen Spektren beobachtbar sind, sind die Banden von nachträglich zuge-

6.2 Strukturierte Verteilung von Analyten auf immobilisierten Silbernanopartikeln

gegebenem Kristallviolett in einigen Spektren an der Grenze nicht zu finden. Die Verteilung der Intensitätsverhältnisse der Adenin- und Cytosinbanden (Abb. 6.10 b) und die Verteilung der Verstärkungsfaktoren (Abb. 6.10 e) in einem Ausschnitt der Grenze, die die Cytosinregion abschließt, korrelieren. Im unteren Teil des untersuchten Ausschnitts liegt ein Cytosinüberschuss vor (Abb. 6.10 b) und der Verstärkungsfaktor ist gleichmäßig größer als 10^5 (Abb. 6.10 e). Beides deutet auf eine gleichmäßige Cytosinregion wie in Abb. 6.10 d hin. Im mittleren Teil des Ausschnitts dagegen finden sich viele Punkte, an denen die SERS-Spektren keine oder schwache Kristallviolettbanden aufweisen und im Vergleich zu den Spektren aus dem unteren Teil ist im mittleren Teil der Einfluss von Adenin auf die Spektren größer. Der Einfluss von Adenin wird im oberen Teil des Ausschnitts noch größer, während die Verstärkungsfaktoren dort wieder zunehmen. Betrachtet man die absoluten Intensitäten für jeweils eine der Ringatemschwingungsbanden (Adenin oder Cytosin) in diesem Ausschnitt, zeigt sich ein ähnlicher Trend wie für den Verstärkungsfaktor (Abbildung nicht gezeigt). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass im mittleren Teil des betrachteten Ausschnitts die Nanopartikeldichte auf der Glasoberfläche geringer ist als am oberen und unteren Rand, sodass zwar die gemeinsam mit den Nanopartikeln aufgetragenen Analytmoleküle, aber keine zusätzlichen Kristallviolett-moleküle, detektiert werden können.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die sequentielle Immobilisierung von Silbernanopartikeln in Gegenwart verschiedener Analytlösungen eine makroskopische Strukturierung von SERS-aktiven Oberflächen ermöglicht. Die auf diese Weise mit Adenin und Cytosin generierten Regionen lassen sich univariat anhand der Ringatemschwingungsbanden in den SERS-Spektren unterscheiden und können somit als Modellsystem für die SERS-Bildgebung dienen. Die parallele Detektion von SERS-Signalen von nachträglich auf die Oberfläche gegebener Kristallviolettlösung bietet die Möglichkeit mit einem internen Standard die SERS-Verstärkung in den jeweils untersuchten Probenbereichen zu quantifizieren und somit Einflüsse auf die Bildgebung durch unterschiedliche Nanopartikelanordnungen festzustellen bzw. auszuschließen.

6.3 Multivariate Unterscheidung von SEHRS-Spektren

Dieser Abschnitt und der folgende Abschnitt 6.4 beschreiben die Übertragung der für die SERS- und Raman-Mikroskopie bekannten Methoden zur Klassifizierung und Bildgebung auf die SEHRS-Mikroskopie anhand von Modellsystemen, die aus immobilisierten Silbernanopartikeln bestehen. Dazu werden hier zunächst die SEHRS-Spektren der verwendeten Analyten und deren Klassifizierung mit Hilfe multivariater Methoden diskutiert.

6.3.1 Qualitative Diskussion der Spektren

Experimente mit kolloidalen Silbernanopartikellösungen und immobilisierten Silbernanopartikeln ohne vorherige Analytstrukturierung zeigen, dass für Adenin und Cytosin, die sich in den Modellsystemen für SERS-Bildgebung in Abschnitt 6.2.2 als geeignet erwiesen haben, SEHRS-Spektren erhalten werden können (Abb. 6.11). Der Vergleich der SEHRS-Spektren von Adenin auf den immobilisierten Silbernanopartikeln (Abb. 6.11 b) und in kolloidaler Lösung (Abb. 6.11 a) zeigt, dass trotz einer mit $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ höheren Adeninkonzentration auf den immobilisierten Partikeln weniger und schwächere Banden als in der kolloidalen Lösung erhalten wurden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass für die Messung der Oberflächen - zur genaueren Fokussierung des Anregungslichts auf der Oberfläche - ein Objektiv mit höherer numerischer Apertur, also geringerem Fokusvolumen, verwendet wurde, sodass ein kleinerer Anteil der Lösung zum tatsächlichen Signal beiträgt ($NA = 0,3$ für die Lösungen, $NA = 1,2$ für die immobilisierten Partikel, die Fokusvolumina unterscheiden sich etwa um einen Faktor von 100, siehe auch S. 43 f.). Theoretisch könnte dies durch höhere Anregungsintensitäten oder längere Integrationszeiten kompensiert werden. Allerdings sind die Oberflächen mit den immobilisierten Nanopartikeln empfindlich gegenüber höheren Anregungsintensitäten, da sie im Gegensatz zu einer Lösung kaum Möglichkeiten haben, die eingestrahlte Energie abzuführen, was im Experiment am Auftreten von Löchern in der Nanopartikelschicht an den Messpunkten erkennbar ist. Längere Integrationszeiten sind im Hinblick auf geplante bildgebende Experimente nicht praktikabel; schon die hier verwendeten 120 s würden zu relativ langen Gesamtmesszeiten führen, die es erschweren zu gewährleisten, dass die Proben nicht austrocknen und dass die Fokussierung erhal-

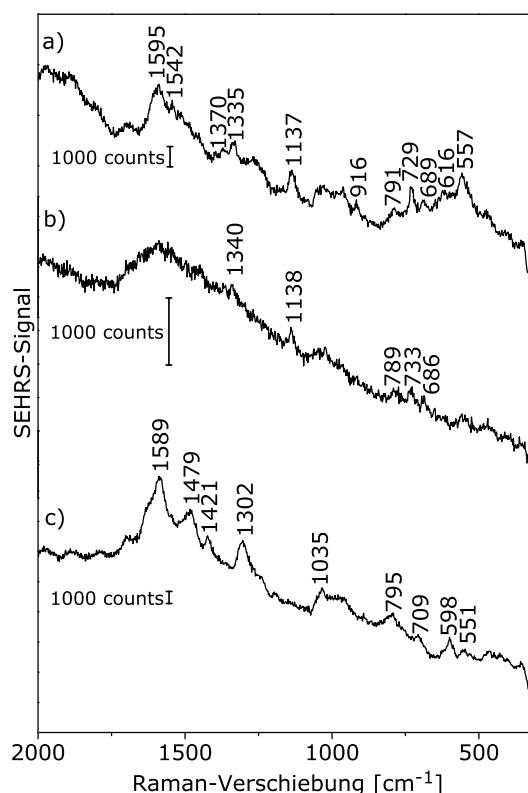


Abb. 6.11: SEHRS-Spektren von (a) Adenin ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) in kolloidaler Silbernanopartikellösung, (b) Adenininlösung ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) auf immobilisierten Silbernanopartikeln und (c) Cytosin ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) in kolloidaler Silbernanopartikellösung. Anregungsbedingungen: 1064 nm, maximale Photonendichte: $1 \cdot 10^{29} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (a, c), $6 \cdot 10^{28} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (b), Integrationszeit: 120 s.

ten bleibt. Außerdem sind die Intensitäten der Banden auch in den SEHRS-Spektren von Adenin und Cytosin in den kolloidalen Lösungen (Abb. 6.11 a und 6.11 c) relativ gering und die Spektren weisen einen zu großen Raman-Verschiebungen hin ansteigenden und, im Vergleich mit den Banden, intensiven Untergrund auf. Beides erschwert eine automatisierte Unterscheidung der Spektren wie sie für die Bildgebung nötig ist.

Um ein Modellsystem zu erhalten, das bei den gegebenen experimentellen Bedingungen intensivere SEHRS-Spektren liefert, wurden Farbstoffe untersucht, die Absorptionsbanden im Spektralbereich der zweiten Harmonischen der Anregungsfrequenz haben. Auf diese Weise kann eine zusätzliche Resonanzverstärkung der Hyper-Raman-Streuung ausgenutzt werden. Die beiden Triphenylmethylnfarbstoffe Kristallviolett und Malachitgrün haben Absorptionsmaxima bei 588 nm bzw. 617 nm, sodass bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 1064 nm die beobachtete Hyper-Raman-Streuung innerhalb der Absorptionsbande liegt (Abb. 6.12). Die chemischen Strukturen dieser

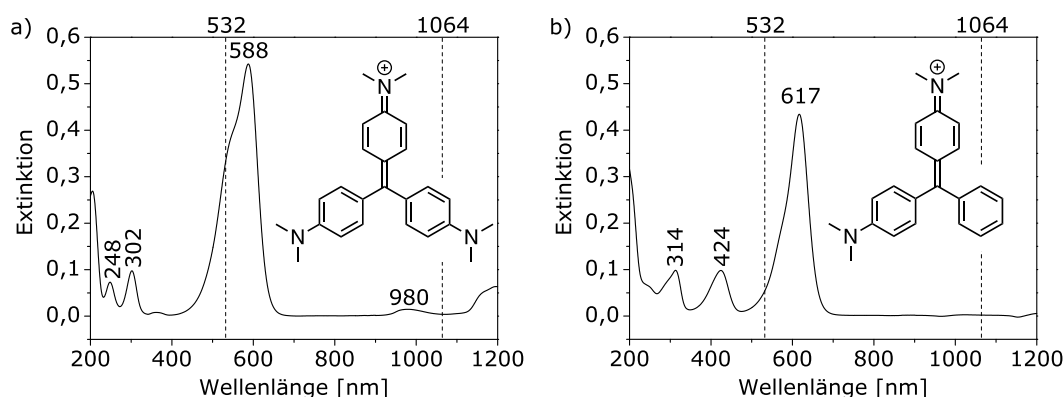


Abb. 6.12: Absorptionsspektren und Strukturen von (a) Kristallviolett und (b) Malachitgrün. Die Messung der Absorptionsspektren erfolgte an wässrigen Lösungen der Farbstoffe mit einer Konzentration von $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Die gestrichelten Linien markieren die Anregungswellenlänge für die SEHRS-Experimente und deren zweite Harmonische.

beiden Farbstoffe unterscheiden sich nur in einer Dimethylaminogruppe (Abb. 6.12). Ihre Raman- und Hyper-Raman-Spektren weisen daher jeweils nur wenige Unterschiede auf.^[150,200]

Deutliche Unterschiede zwischen den SEHRS-Spektren (Abb. 6.13 a) und den SERS-Spektren (Abb. 6.13 b) von Kristallviolett bzw. Malachitgrün zeigen sich in der Bande bei ca. 1620 cm^{-1} , die für beide Farbstoffe in den SEHRS-Spektren wesentlich weniger intensiv ist als in den SERS-Spektren, und in den Doppelbanden bei $1177 \text{ cm}^{-1}/1219 \text{ cm}^{-1}$ bzw. $1366 \text{ cm}^{-1}/1398 \text{ cm}^{-1}$ in den SERS-Spektren von Malachitgrün, an deren Stelle in den SEHRS-Spektren jeweils nur eine Bande vorhanden ist. Für die Banden bei 1620 cm^{-1} und $1366 \text{ cm}^{-1}/1398 \text{ cm}^{-1}$ wird dies von Schneider *et al.*^[150] mit Hilfe von Symmetriebetrachtungen ähnlich des für zentrosymmetrische Moleküle beobachteten Alternativverbots erklärt. Bemerkenswert bei der Betrachtung der SEHRS- und SERS-Spektren dieser beiden Farbstoffe ist die Tatsache, dass zwischen den SEHRS- und SERS-Spektren von Malachitgrün (untere Spektren in Abb. 6.13 a bzw. Abb. 6.13 b) mehr Unterschiede bestehen als zwischen den SEHRS- und SERS-Spektren von Kristallviolett (obere Spektren in Abb. 6.13 a bzw. Abb. 6.13 b), obwohl Kristallviolett eine höhere Symmetrie besitzt und somit unterschiedlichere Auswahlregeln für die ein- und zweiphotonenangeregten Raman-Spektren zu erwarten wären. Dies lässt auf eine Beeinflussung der Molekülsymmetrie von Kristallviolett durch die Silberoberfläche schließen.^[201] Abgesehen von diesen Unterschieden lassen sich jedoch für die meisten Banden in den SEHRS-Spektren von Kristallviolett und Malachitgrün (Abb. 6.13 a), unter Berücksichtigung von teilweise leichten Verschiebungen und unterschiedlichen relativen

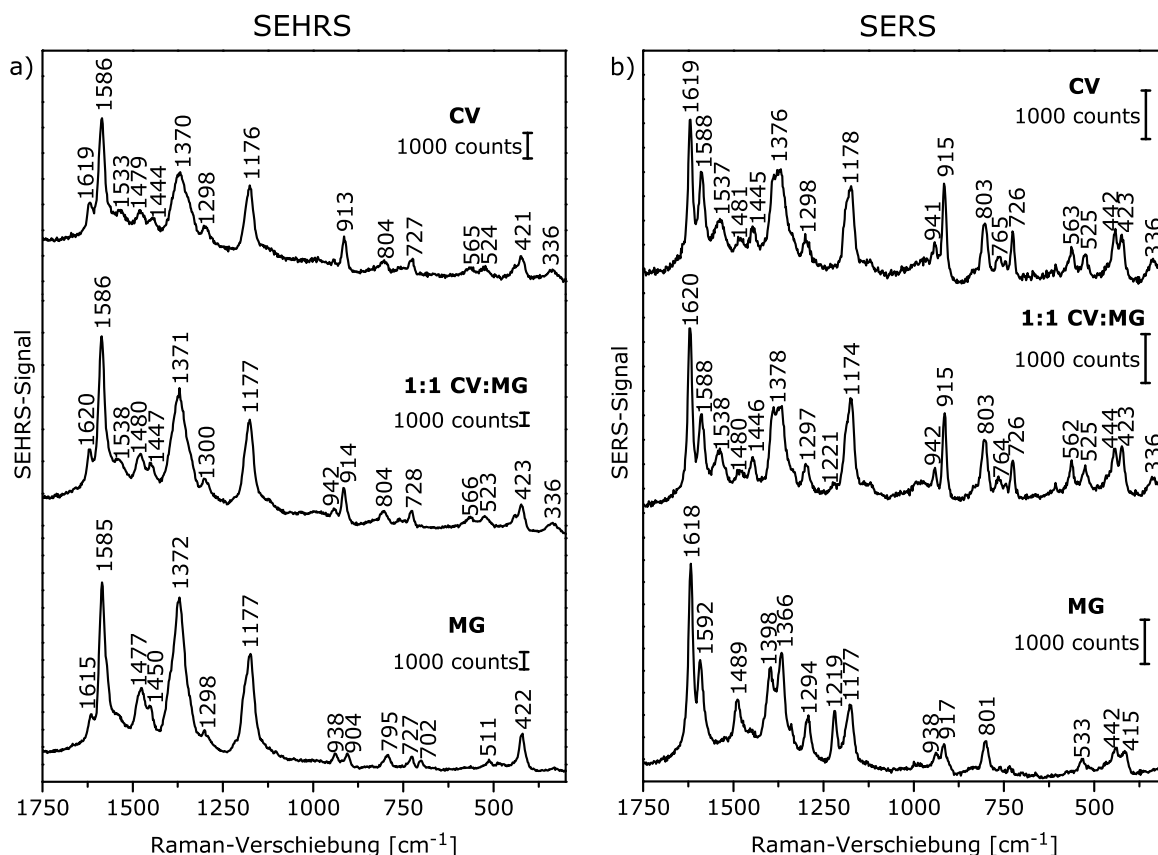


Abb. 6.13: (a) SEHRS- und (b) SERS-Spektren von wässrigen Kristallviolett- und Malachitgrünlösungen sowie einer äquimolaren Mischung beider Analyten auf immobilisierten Silbernanopartikeln. Konzentrationen der Farbstoffe für SEHRS: $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ für die Spektren der reinen Farbstoffe bzw. $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in der Mischung, Konzentrationen der Farbstoffe für SERS: $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ für die Spektren der reinen Farbstoffe bzw. $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ in der Mischung. Anregungsbedingungen: (a) 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $5 \cdot 10^{28} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 30 s; (b, Spektren der reinen Farbstoffe) 532 nm, maximale Photonenflussdichte: $9 \cdot 10^{27} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 100 ms; (b, Mischung) 532 nm, maximale Photonenflussdichte: $4 \cdot 10^{26} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 500 ms.

Intensitäten, Analoga in den entsprechenden SERS-Spektren (Abb. 6.13 b) finden. Die Zuordnung zu den Molekülschwingungen kann somit in Anlehnung an die vorhandene Literatur zur Zuordnung der Banden in resonanten Raman-Spektren erfolgen. Insbesondere für Kristallviolett existieren in der Literatur verschiedene Ansätze hinsichtlich der Bandenzuordnung für SERS- und Raman-Spektren, die auf unterschiedlichen Annahmen hinsichtlich der Symmetrie und auf unterschiedlichen Berechnungsverfahren beruhen und sich zum Teil widersprechen.^[150,200,202–205] Die Zuordnung von Lueck *et al.*^[200] berücksichtigt einige der Widersprüche und beruht auf einem umfangreichen Vergleich der Spektren verschiedener aminosubstituierter Triphenylmethylnfarbstoffe und

Tabelle 6.1: Bandenpositionen in cm^{-1} und Zuordnungen^[200,206] für die SEHRS- und SERS-Spektren von Kristallviolett und Malachitgrün.

| Kristallviolett | | Malachitgrün | | Zuordnung ^a |
|-----------------|------|--------------|------|--|
| SEHRS | SERS | SEHRS | SERS | |
| 1619 | 1619 | 1615 | 1618 | ν N-Phenyl, ν C-C |
| 1586 | 1588 | 1585 | 1592 | ν Ring |
| 1533 | 1537 | | | ν N ⁺ -Phenyl |
| 1479 | 1481 | 1477 | 1489 | δ N(CH ₃) ₂ |
| 1444 | 1445 | 1450 | | δ N(CH ₃) ₂ |
| | | | 1398 | i.p. δ Phenyl |
| 1370 | 1376 | 1372 | 1366 | ν N-Phenyl |
| 1298 | 1298 | 1298 | 1294 | i.p. δ Phenyl |
| | | | 1219 | ν N-C, δ N(CH ₃) ₂ |
| 1176 | 1178 | 1177 | 1177 | i.p. δ Phenyl-H |
| | 941 | 938 | 938 | ν N(CH ₃) ₂ , δ N(CH ₃) ₂ |
| 913 | 915 | 904 | 917 | i.p. δ Phenyl |
| 804 | 803 | 795 | 801 | o.o.p. δ Phenyl-H |
| | 765 | | | ν Phenyl, i.p. δ Phenyl |
| 727 | 726 | 727 | | o.o.p. δ Phenyl-N(CH ₃) ₂ |
| | | 702 | | o.o.p. δ Phenyl |
| 565 | 563 | | | i.p. δ Phenyl |
| 524 | 525 | 511 | 533 | i.p. δ Phenyl |
| | 442 | | 442 | o.o.p. δ Phenyl |
| 421 | 423 | 422 | 415 | o.o.p. δ Phenyl |
| 336 | 336 | | | δ Phenyl-C-Phenyl |

^a ν Streckschwingung, δ Deformationsschwingung,
o.o.p. Schwingung aus der Ebene eines Phenylrings heraus,
i.p. Schwingung in der Ebene

eines weiteren aromatischen Amins. Daher, und insbesondere weil hiermit auch eine direkte Zuordnung für die Spektren von Malachitgrün vorhanden ist, wurde die Zuordnung der SEHRS-Banden von Kristallviolett und Malachitgrün im wesentlichen basierend auf dieser Literatur und im Vergleich mit den SERS-Spektren (Abb. 6.13) durchgeführt (Tabelle 6.1).

Im Gegensatz zu den SERS-Spektren, in denen sich durch die geringere Symmetrie von Malachitgrün deutliche Unterschiede zwischen den beiden Farbstoffen finden

lassen (Abb. 6.13 b), weisen die SEHRS-Spektren der beiden Farbstoffe nur wenige Unterschiede auf. Im einzelnen sind dazu die Dimethyldeformationsbanden bei 1479 cm^{-1} und 1444 cm^{-1} (Positionen für Kristallviolett) zu nennen, deren Intensitätsverhältnis für Malachitgrün größer ist als für Kristallviolett (Abb. 6.13 a). Außerdem ist für die Phenyldeformationsschwingung bei 913 cm^{-1} (Kristallviolett) eine Verschiebung zu 904 cm^{-1} im Spektrum von Malachitgrün zu beobachten, während sich gleichzeitig das Intensitätsverhältnis dieser Bande zu der Streck- und Deformationsbande der Dimethylaminogruppen bei 938 cm^{-1} verändert. Eine schwache Bande bei 702 cm^{-1} tritt ausschließlich in den SEHRS-Spektren von Malachitgrün auf. Diese Bande ist in einphotonenangeregten Raman-Spektren weder für Malachitgrün noch für Kristallviolett zu finden. Eine Bande an dieser Position wurde allerdings auch in Infrarotabsorptionsspektren von Malachitgrün^[142] und dem unsubstituierten Triphenylmethylen^[207] beobachtet und bei letzterem einer C-C-C-Deformationsschwingung aus der Ebene eines der Phenylringe heraus zugeordnet^[206]. Es handelt sich daher offensichtlich um eine Bande, die spezifisch für Malachitgrün ist, aber in normalen Raman-Spektren symmetrieverboten ist und nur in Infrarot- und Hyper-Raman-Spektren auftritt. Ein weiterer Unterschied zwischen den SEHRS-Spektren von Kristallviolett und Malachitgrün ist für die Phenyldeformationsschwingungen in der Ebene bei 565 cm^{-1} und bei 524 cm^{-1} bzw. 511 cm^{-1} erkennbar. Die Bande bei 565 cm^{-1} tritt, analog zur Beobachtung für die SERS-Spektren, nur in den Spektren von Kristallviolett auf. Die Bande bei 524 cm^{-1} in den SEHRS- und SERS-Spektren von Kristallviolett liegt in der Mitte zwischen den Positionen der Banden in den SEHRS-Spektren (511 cm^{-1}) und SERS-Spektren (533 cm^{-1}) von Malachitgrün. Dies könnte die in [150] für einige Banden bei größeren Raman-Verschiebungen beschriebene Tatsache ergänzen, dass die entsprechende Schwingung in Kristallviolett entartet ist, in Malachitgrün aber aufgrund der geringeren Symmetrie in zwei Moden aufspaltet, von denen jeweils eine im Raman- und eine im Hyper-Raman-Spektrum auftreten. Ein weiterer Unterschied zwischen den Spektren der beiden Farbstoffe ist eine Schulter bei größerer Raman-Verschiebung neben der Phenyldeformationsschwingung bei 421 cm^{-1} , die im SEHRS-Spektrum von Kristallviolett, aber nicht im SEHRS-Spektrum von Malachitgrün auftritt. In den SERS-Spektren liegt an dieser Stelle jedoch für beide Farbstoffe eine deutliche, separate Bande vor (Abb. 6.13 b). Die Bande der Deformationsschwingung am zentralen Kohlenstoffatom bei 336 cm^{-1} tritt sowohl für SEHRS als auch für SERS nur in den Spektren von Kristallviolett auf, was der Beobachtung in normalen Raman-Spektren^[200] der bei-

den Farbstoffe entspricht.

Die SEHRS-Spektren und die SERS-Spektren einer äquimolaren Mischung von Kristallviolett und Malachitgrün (Abb. 6.13 a bzw. 6.13 b, mittlere Spektren) haben sowohl hinsichtlich der vorkommenden Banden als auch bezüglich der relativen Intensitäten eine wesentlich größere Ähnlichkeit mit den Spektren von Kristallviolett als mit denen von Malachitgrün. Zum einen kann dies auf einen größeren Raman-Streuquerschnitt von Kristallviolett zurückzuführen sein, der unter anderem durch unterschiedliche Resonanzbedingungen für die beiden Farbstoffe bedingt sein kann (siehe auch die Absorptionsspektren in Abb. 6.12). Zum anderen kann die Dominanz der Kristallviolettssignale auf eine höhere Affinität von Kristallviolett zur Silberoberfläche und damit eine bevorzugte Adsorption hindeuten.

In einem Versuch, die SEHRS-Spektren von Kristallviolett und Malachitgrün univariat zu unterscheiden, wurde das Intensitätsverhältnis der beiden Dimethylamino-Deformationsschwingungsbanden bei 1479 cm^{-1} und 1444 cm^{-1} statistisch untersucht. Da die zusätzliche Dimethylaminogruppe in Kristallviolett der einzige strukturelle Unterschied zwischen den beiden Farbstoffen ist, wäre eine Unterscheidung der Spektren anhand von Moden dieser Gruppe naheliegend. Zudem wurde subjektiv in den Spektren von Kristallviolett ein kleineres Verhältnis der Intensität der Bande bei 1479 cm^{-1} zur Intensität bei 1444 cm^{-1} beobachtet als in den Spektren von Malachitgrün (Abb. 6.13 a). Die statistische Auswertung dieses Intensitätsverhältnisses für die Spektren der beiden einzelnen Farbstoffe und ihrer Mischung zeigt diesen Trend ebenfalls: In den Spektren von Malachitgrün ist das Intensitätsverhältnis zum Teil deutlich größer als für Kristallviolett (Abb. 6.14). Allerdings ist die Varianz des Intensitätsverhältnisses auch innerhalb der Spektren jeweils eines der beiden Farbstoffe relativ groß, so dass Intensitätsverhältnisse zwischen 1 und 4 für beide Farbstoffe vorkommen.

Die Varianz der Intensitätsverhältnisse kann durch eine unterschiedliche Orientierung auf oder unterschiedliche Wechselwirkung mit der Silberoberfläche verursacht werden. Aufgrund der freien Elektronenpaare an den Stickstoffatomen sind die Dimethylaminogruppen, neben dem Carbeniumion, potentielle Wechselwirkungsstellen für die Adsorption an der Silberoberfläche.^[203,208,209] Durch Einflüsse aus der Umgebung, z.B. Variation in der Oberflächenbeschaffenheit oder Anordnung der Silbernanopartikel, kann die Wechselwirkung der Dimethylaminogruppen mit der Silberoberfläche für die einzelnen Moleküle unterschiedlich stark sein, was dann auch die Schwingun-

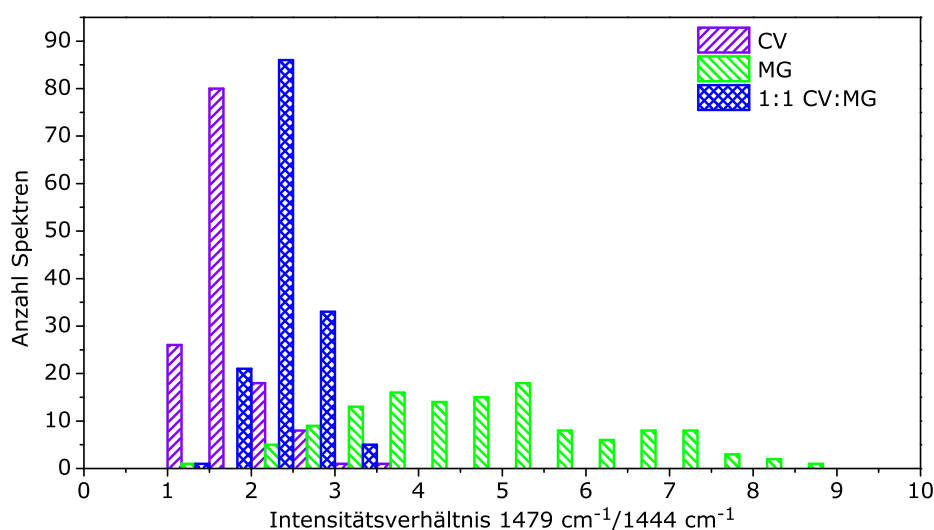


Abb. 6.14: Intensitätsverhältnis der Dimethylamino-Deformationsschwingungsbanden bei 1479 cm^{-1} und 1444 cm^{-1} in den SEHRS-Spektren von Lösungen von Kristallviolett (CV), Malachitgrün (MG) und einer äquimolaren Mischung beider Farbstoffe auf immobilisierten Silbernanopartikeln. Die Intensität im Minimum zwischen den beiden Banden bei ca. 1460 cm^{-1} wurde als Untergrundintensität von der Intensität im Maximum der jeweiligen Bande subtrahiert.

gen dieser Gruppen und damit die relativen Intensitäten der entsprechenden Banden in den SEHRS-Spektren beeinflusst. Daher ist basierend auf der univariaten Untersuchung keine eindeutige Klassifizierung der SEHRS-Spektren von Kristallviolett und Malachitgrün möglich.

6.3.2 Klassifizierung

Multivariate Analysemethoden ermöglichen die Unterscheidung von Spektren unter Berücksichtigung mehrerer (oder aller) Banden und können auf diese Weise subtilere Unterschiede sichtbar machen als univariate Auswertungen.^[141] Im Folgenden werden daher Untersuchungen der SEHRS-Spektren von Kristallviolett, Malachitgrün und deren Mischung mittels hierarchischer Clusteranalyse (HCA) und Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*, PCA) diskutiert. Sowohl PCA als auch HCA wurden zum einen für den Spektralbereich von 380 bis 1700 cm^{-1} durchgeführt, der alle im vorliegenden Experiment beobachteten Banden enthält, zum anderen für einen kleineren Spektralbereich zwischen 380 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} .

Abb. 6.15 zeigt die Ergebnisse von hierarchischen Clusteranalysen der SEHRS-Spektren der beiden Farbstoffe. Die Auswahl des Spektralbereichs beeinflusst das Ergebnis der Analyse: Wird der größere Bereich verwendet ($380\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, Abb. 6.15 a),

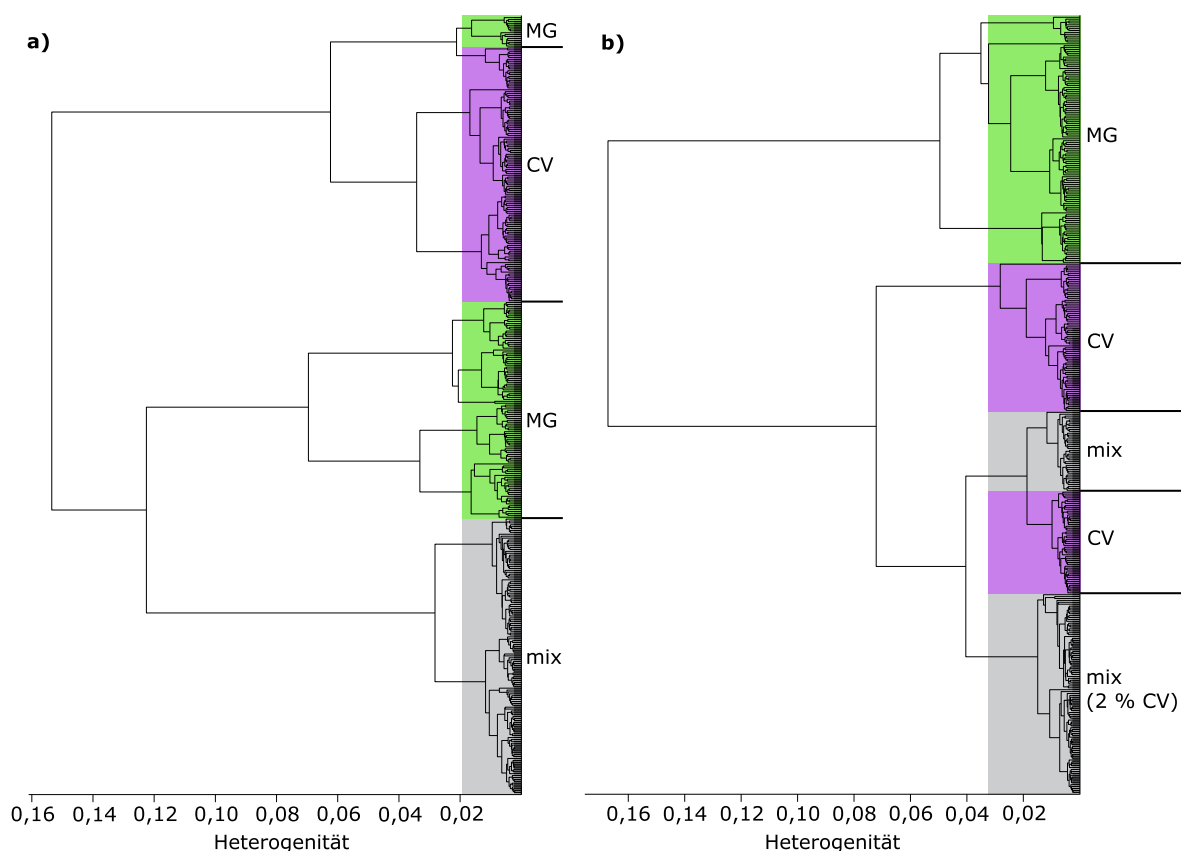


Abb. 6.15: Ergebnisse von hierarchischen Clusteranalysen der SEHRS-Spektren von Lösungen von Kristallviolett (CV), Malachitgrün (MG) und einer äquimolaren Mischung (mix) dieser beiden Farbstoffe auf immobilisierten Silbernanopartikeln. Verwendeter Spektralbereich: (a) $380\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (b) $380\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$.

bilden sich grundsätzlich drei separate Cluster für die Spektren von Kristallviolett, Malachitgrün bzw. der äquimolaren Mischung. Allerdings wird ein Teil der Malachitgrünspektren dem Cluster zugeordnet, der hauptsächlich Kristallviolettspektren enthält (Abb. 6.15 a, oben). Bei Verwendung des kleineren Spektralbereichs zwischen 380 und 1000 cm^{-1} werden dahingegen die Spektren von Malachitgrün vollständig in einem eigenen Cluster gesammelt, was der erwarteten Gruppierung entspricht. Die Spektren von Kristallviolett und der Mischung bilden einen gemeinsamen übergeordneten Cluster, der sich weiter aufspaltet in einen Cluster, der nur Kristallviolettspektren enthält und einen Cluster, der mehrere Gruppen von Kristallviolett- bzw. Mischungsspektren enthält (Abb. 6.15 b). Die gemeinsame Gruppierung der Spektren von Kristallviolett und Mischung spiegelt die subjektive Beobachtung wider, dass die Spektren der Mischung eine größere Ähnlichkeit zu den Spektren von Kristallviolett haben als zu

denjenigen von Malachitgrün (siehe auch Abb. 6.13 a). Die Verwendung des kleineren Spektralbereichs in der HCA ermöglicht also, insbesondere durch die klare Separierung der Malachitgrünspektren, eine realistischere Unterscheidung der SEHRS-Spektren der Farbstoffe als die Verwendung des größeren Spektralbereichs. Demnach enthalten die Spektren im Bereich oberhalb von 1000 cm^{-1} Varianz, die nicht direkt durch die chemischen Unterschiede zwischen den beiden Farbstoffen verursacht wird.

Bei den SERS-Spektren hat die Auswahl des Spektralbereichs im Gegensatz zu den SEHRS-Spektren keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse. SERS-Spektren von Kristallviolett, Malachitgrün und der Mischung werden jeweils ohne Fehlzuordnungen in drei separate Cluster getrennt, wobei Kristallviolett- und Mischungsspektren einem gemeinsamen übergeordneten Cluster zugeordnet werden (Abbildung nicht gezeigt).

Eine weitere Möglichkeit, die Unterschiede zwischen den SEHRS- und SERS-Spektren der beiden Farbstoffe zu untersuchen und damit eine Klassifizierung zu ermöglichen, ist die PCA. Gegenüber der Clusteranalyse bietet die PCA den Vorteil, dass sich durch eine Betrachtung der Loadings Rückschlüsse auf diejenigen Banden, die für die Unterscheidung der verschiedenen Spektren wichtig sind, ziehen lassen.

Eine Trennung der SEHRS-Spektren der beiden Farbstoffe ist, basierend auf den Scores der ersten beiden Hauptkomponenten der PCA dieser Spektren, unabhängig vom verwendeten Spektralbereich möglich (Abb. 6.16 a und 6.16 c). Allerdings erfolgt die Trennung bei der Verwendung des größeren Spektralbereichs entlang der zweiten Hauptkomponente (Abb. 6.16 a), während für den kleineren Spektralbereich eine Trennung entlang der ersten Hauptkomponente zu erkennen ist (Abb. 6.16 c). Sowohl die Loadings der zweiten Hauptkomponente bei Verwendung des großen Spektralbereichs (Abb. 6.16 b, unten) als auch die Loadings der ersten Hauptkomponente bei Verwendung des kleinen Spektralbereichs (Abb. 6.16 d, oben) zeigen eine intensive Bande bei ca. 915 cm^{-1} . Dort befindet sich in den Kristallviolettspektren eine Phenyldeformationsbande, die in den Malachitgrünspektren bei einer kleineren Raman-Verschiebung liegt. Dies zeigt, dass die für die Trennung der Spektren der beiden Farbstoffe relevanten spektralen Merkmale unabhängig vom verwendeten Spektralbereich sind, aber durch die Einflüsse weiterer Varianz unterschiedlich gewichtet werden.

Die dominanten Banden in den Loadings der ersten Hauptkomponente unter Verwendung des großen Spektralbereichs sind zugleich die drei intensivsten Banden in den SEHRS-Spektren beider Farbstoffe (1587 , 1373 und 1174 cm^{-1}) und liegen oberhalb von

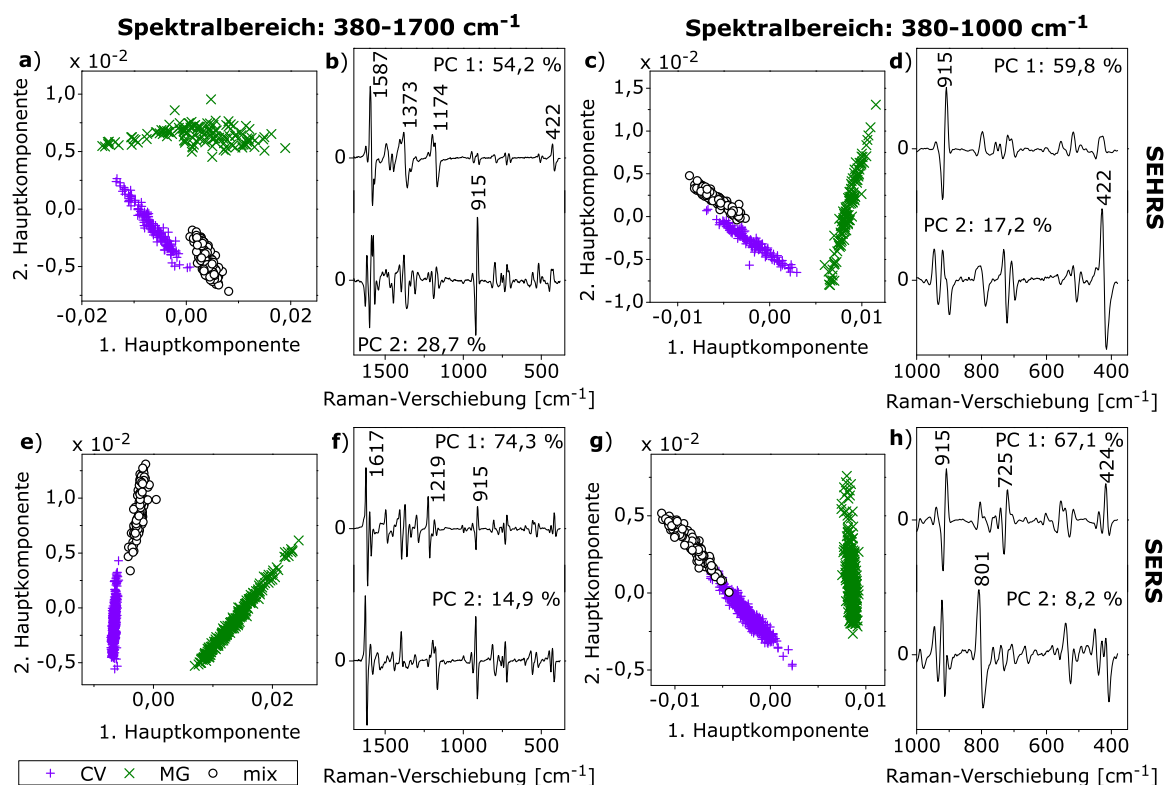


Abb. 6.16: (a-d) Scores (a,c) und Loadings (b,d) der ersten beiden Hauptkomponenten (PC) aus Hauptkomponentenanalysen der SEHRS-Spektren von Lösungen von Kristallviolett (CV, +), Malachitgrün (MG, x) und einer äquimolaren Mischung dieser beiden Farbstoffe (mix, o) auf immobilisierten Silbernanopartikeln. Untersucht wurden die Spektralbereiche von 380-1700 cm⁻¹ (a-b) und von 380-1000 cm⁻¹ (c-d). Der Anteil der Varianz der Daten, der durch die jeweilige PC erklärt wird, ist in (b,d) angegeben. (e-h) Entsprechende Ergebnisse der Hauptkomponentenanalysen eines SERS-Datensatzes der gleichen Farbstoffe.

1000 cm⁻¹ (Abb. 6.16 b, oben), das heißt in dem Bereich der Spektren, der für die Analyse in Abb. 6.16 c und 6.16 d nicht verwendet wurde. Die an sich größte Varianz in den SEHRS-Spektren der beiden Farbstoffe zwischen 1000 cm⁻¹ und 1700 cm⁻¹ wird also in der PCA des kleineren Spektralbereichs nicht berücksichtigt. Dieser Spektralbereich ist jedoch wichtig für die Unterscheidung der SEHRS-Spektren des reinen Kristallvioletts und der Mischung aus Kristallviolett und Malachitgrün, die in der Auftragung der Scores (Abb. 6.16 a) dicht nebeneinander liegen und sich anhand der zweiten Hauptkomponente, die eine Trennung der Spektren der Reinsubstanzen ermöglicht, nicht separieren lassen. Da die Gruppe der Malachitgrünspektren entlang der ersten Hauptkomponente ebenfalls relativ breit verteilt ist (Abb. 6.16 a), ist anzunehmen, dass ein Teil der Varianz im Bereich von 1000 bis 1700 cm⁻¹ durch Unterschiede in der Adsorp-

tionsgeometrie der Farbstoffmoleküle verursacht wird und nicht durch Unterschiede in der Molekülstruktur selbst. Solche Unterschiede bei der Adsorption können entweder durch unterschiedliche Oberflächeneigenschaften und Anordnung der immobilisierten Silbernanopartikel oder, wie beim Vergleich der Kristallviolett- und Mischungsspektren, durch Konkurrenz und gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Farbstoffmoleküle auf der Silberoberfläche entstehen.

Bei der Verwendung des kleineren Spektralbereichs in der PCA wird die Varianz bei größeren Raman-Verschiebungen ignoriert, sodass der Unterschied zwischen den Spektren der reinen Farbstoffe, der hauptsächlich in der Bande bei 915 cm^{-1} zu finden ist, wichtiger wird. Die Spektren des reinen Kristallvioletts und der Mischung können dennoch auch bei Betrachtung des kleineren Spektralbereichs unterschieden werden, allerdings anhand der zweiten Hauptkomponente (Abb. 6.16 c), die eine große Varianz bei 422 cm^{-1} impliziert (Abb. 6.16 d, unten). Eine schwache Bande bei 422 cm^{-1} ist auch in den Loadings der ersten Hauptkomponente bei Verwendung des großen Spektralbereichs zu finden (Abb. 6.16 b), diese Bande trägt also auch dort zur Trennung der Spektren des reinen Kristallvioletts von denen der Mischung bei. Da die Phenyldeformationsschwingungsbande an dieser Position in den Kristallviolett- und Mischungsspektren eine Schulter besitzt, in den Malachitgrünspektren aber nicht (Abb. 6.13 a), ist anzunehmen, dass der Beitrag der Schulter zu der Bande in den Mischungsspektren anders ist als in den Spektren des reinen Kristallvioletts.

Die PCA der SERS-Spektren ermöglicht ebenfalls eine Trennung der beiden Farbstoffe und ihrer Mischung (Abb. 6.16 e-h). Allerdings werden im SERS-Datensatz die Spektren der reinen Farbstoffe, im Gegensatz zu den SEHRS-Spektren, für beide Spektralbereiche entlang der ersten Hauptkomponente getrennt (Abb. 6.16 e und 6.16 g). Das ist dadurch bedingt, dass die SERS-Spektren von Kristallviolett und Malachitgrün deutlichere Unterschiede aufweisen (Abb. 6.13 b), insbesondere sind einige Banden nur in den Spektren jeweils eines der beiden Farbstoffe zu finden (z. B. 1219 cm^{-1} für Malachitgrün und 726 cm^{-1} für Kristallviolett). Die Loadings (Abb. 6.16 f und 6.16 h, jeweils oben) zeigen einen starken Beitrag dieser zusätzlichen Banden zur Varianz des SERS-Datensatzes, aber auch einen Einfluss der Bande bei 915 cm^{-1} , die auch schon für den SEHRS-Datensatz als wichtiger Unterschied zwischen den beiden Farbstoffen identifiziert wurde.

Ähnlich wie für den SEHRS-Datensatz ist für die Abgrenzung der SERS-Spektren der Mischung, die denen des reinen Kristallvioletts sehr ähnlich sind, eine weitere,

nämlich die zweite, Hauptkomponente erforderlich. Ein Unterschied für den SERS-Datensatz besteht jedoch darin, dass die durch die zweite Hauptkomponente repräsentierte Varianz im wesentlichen auf den gleichen Banden beruht wie bei der ersten Hauptkomponente (Abb. 6.16 f und 6.16 h), nur bei Verwendung des kleineren Spektralbereiches wird ein Einfluss einer weiteren Bande bei 801 cm^{-1} deutlich (Abb. 6.16 h). Der Unterschied zwischen den SERS-Spektren der Mischung und des reinen Kristallvioletts ist somit zwar schwächer ausgeprägt, beruht aber auf den gleichen molekularen Schwingungen wie der Unterschied zwischen den SERS-Spektren der beiden reinen Farbstoffe. Bei den SEHRS-Spektren hingegen, wo die Unterschiede zwischen den beiden Farbstoffen ohnehin subtiler sind, lassen sich in der PCA Einflüsse verschiedener struktureller Gruppen der Moleküle erkennen, abhängig davon, ob die reinen Farbstoffe untereinander oder mit der Mischung verglichen werden. Dies kann auf die größere Empfindlichkeit von SEHRS gegenüber der Adsorptionsgeometrie^[10] und der Molekül-Metall-Wechselwirkung zurückgeführt werden (siehe auch Abschnitt 4.4). Die PCA von SEHRS-Daten der hier untersuchten Farbstoffe liefert also entscheidende Zusatzinformationen im Vergleich mit den SERS-Daten, was für die Untersuchung von Verteilungen der Farbstoffe auf plasmonischen Oberflächen von Vorteil ist, wie in Abschnitt 6.4 gezeigt werden wird.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle feststellen, dass sowohl die HCA als auch die PCA eine Unterscheidung von Kristallviolett und Malachitgrün anhand ihrer SEHRS- und SERS-Spektren ermöglichen. Dabei liefert die PCA zusätzliche Informationen über die spektralen Merkmale, die für die Unterscheidung relevant sind, und kann somit verschiedene Einflüsse auf die Spektren beschreiben. So lässt sich mit Hilfe der Informationen aus der PCA erklären, weshalb die Unterscheidung der beiden Farbstoffe anhand der HCA der SEHRS-Spektren unter Verwendung des kleinen Spektralbereichs von 380 bis 1000 cm^{-1} besser funktioniert: Die Verringerung des betrachteten Spektralbereichs führt dazu, dass Varianz zwischen den einzelnen Spektren, die nicht eindeutig den Unterschieden zwischen den beiden Farbstoffen an sich zugeordnet werden kann, ignoriert wird. Der kleinere Spektralbereich zwischen 380 und 1000 cm^{-1} ermöglicht somit zwar teilweise deutlichere oder korrektere Trennungen der beiden Farbstoffe, aber der Rest der Spektren im Spektralbereich zwischen 1000 und 1700 cm^{-1} enthält trotzdem wichtige Informationen, insbesondere hinsichtlich der Wechselwirkung zwischen den Farbstoffmolekülen und der Silberoberfläche. Interessant ist, dass die anhand der PCA identifizierten unterscheidungsrelevanten spektralen Merkmale aus-

schließlich in den Phenylbanden bestehen, obwohl der einzige strukturelle Unterschied zwischen Kristallviolett und Malachitgrün in der An- bzw. Abwesenheit der dritten Dimethylaminogruppe besteht, deren Banden für eine Unterscheidung der Spektren nicht herangezogen werden können (Abb. 6.14). Dies lässt sich durch einen starken Einfluss der Dimethylaminogruppen auf die konjugierten π -Systeme der Phenylringe, die Molekülsymmetrie und die Adsorptionsgeometrie der Moleküle auf der Silberoberfläche erklären.

6.4 Hyperspektrale SEHRS-Bildgebung

Die in Abschnitt 6.3 gezeigte multivariate Unterscheidung von Farbstoffen anhand ihrer SEHRS-Spektren soll im Folgenden für die SEHRS-Bildgebung angewandt werden. Dazu werden in diesem Abschnitt zunächst die untersuchten Proben und die durch diese gegebene Fragestellung beschrieben. Darauf folgend werden verschiedene Einflüsse auf die Klassifizierung der SEHRS- und SERS-Spektren dieser Proben diskutiert und schließlich die Vorgehensweise zur hyperspektralen Kartierung dargestellt.

6.4.1 Beschreibung der Proben und der zu unterscheidenden Probenregionen

In Abschnitt 6.2.2 wurde beschrieben, dass plasmonische Oberflächen mit einer anhand der SERS-Spektren verfolgbaren Struktur entstehen, wenn Silbernanopartikel in Gegenwart von verschiedenen Analyten nacheinander in unterschiedlichen Regionen einer Glasoberfläche immobilisiert werden. Ein Nachteil dieser Präparationsmethode ist jedoch, dass in den Grenzregionen teilweise geringere Oberflächenverstärkungen beobachtet werden, die auf veränderte Partikelanordnungen oder verringerte Partikeldichten in diesen Regionen hindeuten. SEHRS ist noch empfindlicher als SERS gegenüber Änderungen der Nanopartikelanordnungen^[77] und der chemischen Umgebung^[11] (siehe auch Abschnitt 4.4 und Kapitel 7), daher ist eine gleichmäßige Partikelverteilung für die Anwendung der strukturierten Oberflächen als Modellsysteme für die SEHRS-Bildgebung von großer Bedeutung. Außerdem sind die verwendbaren Analytkonzentrationen während der Immobilisierung der Nanopartikel relativ gering, weil analytinduzierte Aggregation vermieden werden sollte, da die Stabilität der kolloidalen Lösung über einen Zeitraum von mehreren Stunden gewährleistet sein muss.

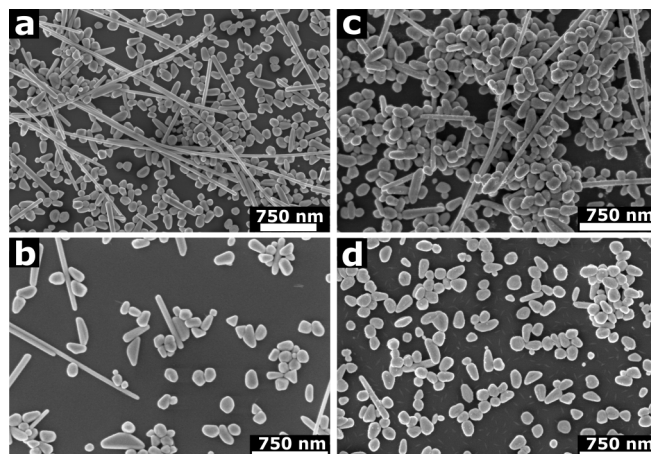


Abb. 6.17: SEM-Aufnahmen der immobilisierten Silbernanopartikel (a, b) ohne Analyten und (c, d) nach sequentielltem Eintauchen in $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Kristallviolett- und Malachitgrünlösungen.

SEHRS hat jedoch einen geringeren Streuquerschnitt als SERS. Daher sind, zumindest für eine erste Machbarkeitsuntersuchung, geringfügig höhere Analytdichten auf der Oberfläche wünschenswert. Für die SEHRS-Experimente wurde die Präparation deshalb dahingehend modifiziert, dass die Nanopartikel zuerst ohne Analyten auf den Glasoberflächen immobilisiert wurden und anschließend jeweils Teile der resultierenden Substrate nacheinander in Lösungen verschiedener Farbstoffe (Kristallviolett bzw. Malachitgrün) eingetaucht wurden.

SEM-Aufnahmen der immobilisierten Silbernanopartikel ohne Farbstoffe zeigen Regionen mit unterschiedlichen Nanopartikeldichten (Abb. 6.17 a-b). Die Partikeldichte in den verschiedenen Regionen liegt zwischen 10 und 90 Nanopartikeln pro μm^2 . Immobilisierte Silbernanopartikel, die nacheinander in eine $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Kristallviolett- bzw. Malachitgrünlösung eingetaucht wurden, weisen mit Nanopartikeln ohne Farbstoffe vergleichbare Partikelanordnungen und Partikeldichten auf (Abb. 6.17 c-d). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Farbstofflösungen bei dieser Konzentration die immobilisierten Nanopartikel nicht wesentlich beeinflussen. Nach anfänglichen Versuchen mit den $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Farbstofflösungen wurden dennoch für die bildgebenden Experimente Farbstofflösungen einer kleineren Konzentration von $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ verwendet, um zu vermeiden, dass beim Eintauchen und anschließenden Trocknen der Proben eine zu starke Aufkonzentrierung stattfindet, auch im Hinblick auf mögliche Austauscheffekte beim Eintauchen in die jeweils zweite Farbstofflösung.

Für die Abschätzung des Bedeckungsgrades der verfügbaren Silberoberfläche mit Farbstoffmolekülen in den hergestellten Proben muss eine Reihe von Annahmen ge-

troffen werden. Zunächst wird, zur Ermittlung der verfügbaren Silberoberfläche, die mittlere Größe der Nanopartikel und deren Anzahl auf einer definierten Fläche der Probe ermittelt (Tabelle 6.2). Da diesbezüglich für die stäbchenförmigen Partikel mit ihren unterschiedlichen Seitenverhältnissen keine Verallgemeinerung möglich ist, werden nur diejenigen Partikel berücksichtigt, deren Form näherungsweise als sphärisch betrachtet werden kann, was für die Mehrzahl der Partikel zutrifft. Zudem wird durch die Bindung an die Glasoberfläche und durch benachbarte bzw. übereinanderliegende Partikel ein Teil der Oberfläche der einzelnen Nanopartikel abgeschirmt und ist daher nicht für die Adsorption von Analyten verfügbar. Es wird pauschal angenommen, dass 75 % der Oberfläche jedes Nanopartikels verfügbar sind. Basierend auf dem Platzbedarf eines Kristallviolett-moleküls auf einer Silberoberfläche, der von Kudelski *et al.* anhand des Vergleichs mit Rhodamin 6G für parallel zur Oberfläche adsorbierte Moleküle geschätzt wurde,^[210] kann ermittelt werden, wie viele Kristallviolett-moleküle auf der in den vorliegenden Proben vorhandenen Silberoberfläche Platz haben, wenn eine Monolage aus Farbstoffmolekülen gebildet wird (Tabelle 6.2). Der Platzbedarf von Malachitgrün-molekülen auf Oberflächen ist nicht aus der Literatur bekannt, kann jedoch aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit näherungsweise als identisch mit dem von Kristallviolett angenommen werden. Die reale Anzahl der Farbstoffmoleküle, die an der Oberfläche der Silbernanopartikel adsorbieren, während sich die Probe in der

Tabelle 6.2: Daten zur Abschätzung der Bedeckung der immobilisierten Silbernanopartikel mit Farbstoffmolekülen in den Proben für die bildgebenden SEHRS-Experimente.

| | |
|---|--------------------------------------|
| Mittlerer Partikeldurchmesser^a | (133 ± 40) nm |
| Anzahl Nanopartikel auf 1 µm² der Probe^{a, b} | 30 |
| Verfügbare Nanopartikeloberfläche pro 1 µm² der Probe^c | 1 · 10 ⁶ nm ² |
| Platzbedarf eines CV-Moleküls auf einer Ag-Oberfläche^[210] | 4 nm ² |
| Anzahl CV-Moleküle für eine Monolage auf 1 µm² der Probe | 3 · 10 ⁵ |
| Konzentration der CV-Lösung | 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ |
| Anzahl der CV-Moleküle auf 1 µm² der Probe^d | 3 · 10 ⁵ |
| Bedeckungsgrad | 100 % |

^a Annähernd sphärische Partikel.

^b Median der Werte aus verschiedenen SEM-Aufnahmen einer Probe ohne Analyten.

^c Annahme: 75 % der Nanopartikeloberfläche sind nach der Bindung an die Glasoberfläche für die Adsorption von Analyten verfügbar.

^d Annahme: Ein 0,5 mm dicker Flüssigkeitsfilm verbleibt nach dem Herausnehmen der Probe aus der Farbstofflösung und trocknet ein.

entsprechenden Lösung befindet, ist nicht bekannt. Allerdings kann grob abgeschätzt werden, wie viele Farbstoffmoleküle sich in dem verbleibenden Flüssigkeitsfilm nach dem Herausnehmen der Probe aus der Lösung befinden und somit letztendlich auf der Oberfläche der fertigen Probe vorhanden sind (Tabelle 6.2). Die dazu angenommene Dicke dieses Flüssigkeitsfilms von 0,5 mm ist großzügig geschätzt, sodass davon auszugehen ist, dass die tatsächliche Molekülanzahl geringer ist. Der resultierende Bedeckungsgrad von 100 % ist daher die obere Grenze. Die weiteren Vereinfachungen der Rechnung – Vernachlässigung der Adsorption von Farbstoffmolekülen, während sich die Probe in der Lösung befindet, einerseits und Vernachlässigung der Oberfläche der stäbchenförmigen Nanopartikel andererseits – sollten sich im wesentlichen ausgleichen. Als letzter Punkt sei angemerkt, dass in den Mischregionen, da sie nacheinander in beide Farbstofflösungen getaucht werden, insgesamt eine höhere Bedeckung anzunehmen ist als in den Regionen, die nur einen der beiden Farbstoffe enthalten. Insgesamt ergibt sich somit eine Bedeckung der Silberoberfläche mit 1 bis 2 Monolagen der Farbstoffmoleküle bei planarer Adsorptionsgeometrie. Es können also alle vorhandenen Farbstoffmoleküle zum SEHRS- bzw. SERS-Signal beitragen. Zudem kann auf diese Weise angenommen werden, dass näherungsweise alle Farbstoffmoleküle an der Silberoberfläche adsorbieren und somit Austauscheffekte während des zweiten Tauchschrilles oder während der Messung minimiert werden.

Im Folgenden soll die SEHRS-Bildgebung anhand von zwei Proben diskutiert werden. Bei der ersten Probe (als „MG/mix“ bezeichnet), wurde ein Glasplättchen mit immobilisierten Silbernanopartikeln zuerst vollständig in eine Malachitgrünlösung und anschließend zur Hälfte in eine Kristallviolettlösung getaucht, sodass eine reine Malachitgrünregion und eine Mischregion, die beide Farbstoffe enthält, gebildet wurden (Abb. 6.18 a). Bei der zweiten Probe wurde die Reihenfolge der Farbstofflösungen umgekehrt, sodass diese, als „CV/mix“ bezeichnete, Probe eine reine Kristallviolettregion und eine Mischregion aufweist (Abb. 6.18 b). Für beide Proben wurden zunächst SEHRS- und SERS-Spektren an verschiedenen Stellen der beiden diskreten Regionen (Malachitgrün- und Mischregion bzw. Kristallviolett- und Mischregion) gemessen. Diese Spektren dienen später, bei der Kartierung der Grenzregion, als Referenzspektren. Die Grenze zwischen den beiden Regionen erstreckt sich über mehrere Millimeter, da durch die Bewegung der Lösung bei der Probenpräparation die Benetzung der Probe in der Nähe der Oberfläche der Flüssigkeit variiert. Um einerseits einen möglichst großen Teil des Übergangs zu erfassen und andererseits eine möglichst gute Ortsauflösung

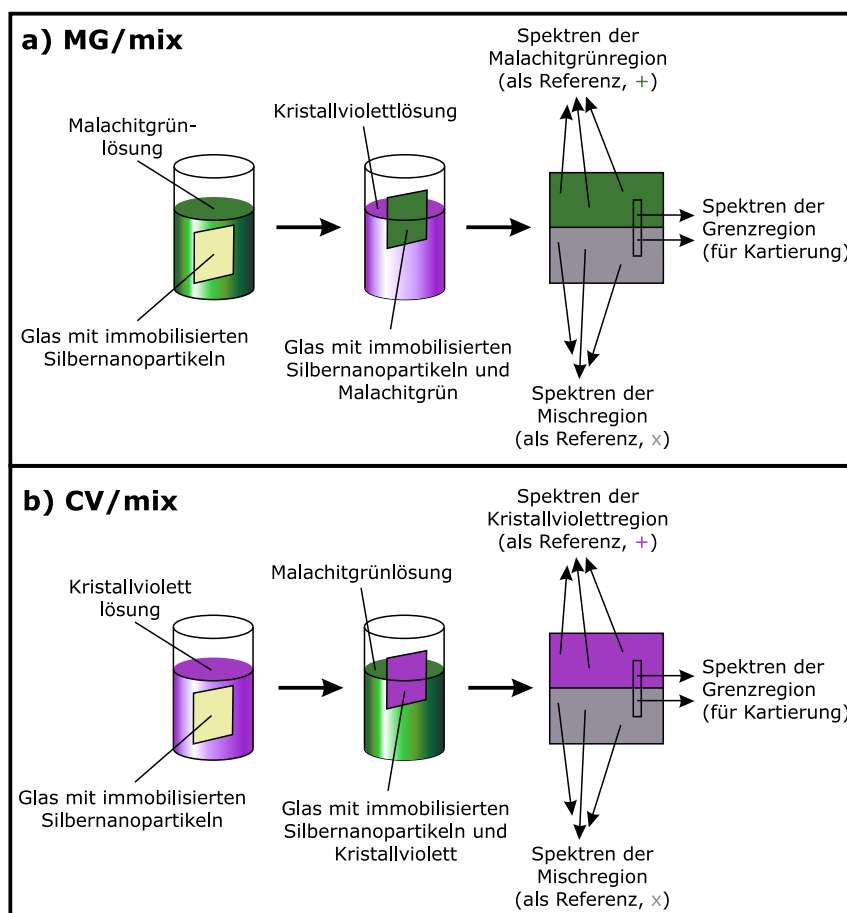


Abb. 6.18: Schematische Darstellung der Herstellung und der in den SEHRS- und SERS-Experimenten untersuchten Probenregionen der (a) MG/mix- und (b) CV/mix-Probe. Die Symbole, die für die Referenzspektren angegeben sind, werden ebenso in Abb. 6.20 und Abb. 6.21 verwendet. Abbildung nicht skaliert.

zu erzielen, wurden entlang einer etwa 2 mm langen Linie über die Grenze hinweg mehrere kleine Bereiche zusammengesetzt, innerhalb derer die Abstände zwischen den Messpunkten jeweils 20 μm betragen (siehe Markierung der Grenzregionen in Abb. 6.18 bzw. Darstellung der Messpunkteraster in Abb. 6.20 a und Abb. 6.21 a).

Die Spektren aus der Malachitgrünregion der MG/mix-Probe (Abb. 6.19 a, e) und aus der Kristallviolettregion der CV/mix-Probe (Abb. 6.19 d, h) unterscheiden sich im wesentlichen in den gleichen Merkmalen wie die Spektren von Lösungen der beiden Farbstoffe (siehe Abb. 6.13 und S. 112 ff.). Ebenfalls wie bei den Spektren der gemischten Lösung der Farbstoffe (Abb. 6.13) ist bei den Spektren aus den Mischregionen ein größerer Einfluss von Kristallviolett als von Malachitgrün zu beobachten (Abb. 6.19 b, c, f, g). Dies gilt für beide Proben, also unabhängig von der Reihenfolge,

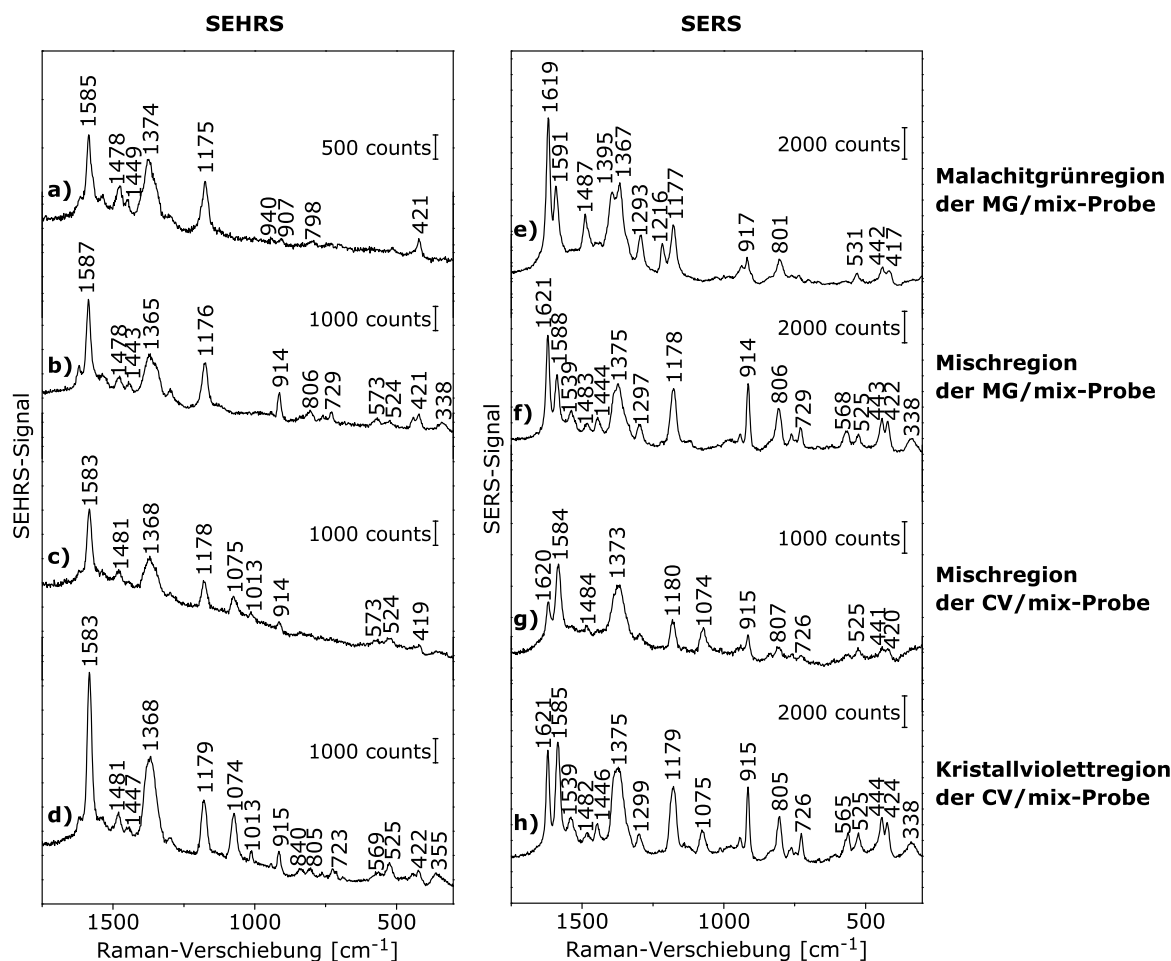


Abb. 6.19: (a-d) Exemplarische SEHS- und (e-h) SERS-Spektren aus den jeweils zwei Regionen der MG/mix- bzw. der CV/mix-Probe. Anregungswellenlänge: 1064 nm (a-d), 532 nm (e-h); maximale Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{28}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a, b), $1 \cdot 10^{28}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (c), $3 \cdot 10^{28}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (d), $2 \cdot 10^8 \text{ W cm}^{-2}$ (e-h); Integrationszeit: 30 s (a-d), 1 s (e,f), 0,5 s (g, h).

in der die Farbstoffe auf die Proben aufgebracht wurden.

In den Spektren der CV/mix-Probe fallen eine Bande bei 1075 cm^{-1} in den SEHS- und SERS-Spektren und eine Bande bei 1013 cm^{-1} in den SEHS-Spektren auf. Diese beiden Banden treten in allen Spektren dieser Probe auf, aber in keinem der anderen Spektren von Kristallviolett oder Malachitgrün und lassen sich anhand von Literaturdaten keinem der beiden Farbstoffe zuordnen. Es muss sich also um eine Verunreinigung oder um Signale von Citrat bzw. APTES, die als Stabilisator bzw. zur Bindung der Nanopartikel an die Glasoberfläche verwendet wurden, handeln. Banden bei vergleichbaren Positionen können in SERS-Spektren von Citrat auftreten, jedoch üblicherweise im umgekehrten Intensitätsverhältnis.^[67,199] Die Herkunft dieser beiden Banden kann

somit nicht eindeutig geklärt werden. Da sie jedoch nicht mit den Signalen der Farbstoffe überlagern und sehr gleichmäßig in allen Spektren dieser Probe auftreten, sollten sie die weitere Analyse nicht stören.

6.4.2 Multivariate Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Klassifizierung

Die Klassifizierung der SEHRS- und SERS-Spektren aus den verschiedenen Regionen der MG/mix- und der CV/mix-Probe mittels multivariater Analyse erfolgte im Hinblick auf die Erkenntnisse aus Abschnitt 6.3 basierend auf zwei verschiedenen Spektralbereichen: $380\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ und $380\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. Mit dem kleineren Spektralbereich wird zudem ein Einfluss der beiden zusätzlichen Banden in den Spektren der CV/mix-Probe ausgeschlossen.

Abb. 6.20 zeigt die Ergebnisse von Hauptkomponentenanalysen der SEHRS-Spektren der MG/mix-Probe. Der verwendete Datensatz beinhaltet die Spektren, die in den beiden diskreten Regionen, Malachitgrün- bzw. Mischregion (grüne „+“ bzw. graue „x“ in Abb. 6.20 b und 6.20 d), weit entfernt von der Grenze zwischen diesen beiden Regionen, gemessen wurden, und die Spektren aus der Grenzregion. Das Messpunkteraster in der Grenzregion wurde willkürlich unterteilt (verschiedene Farben und Symbole in Abb. 6.20 a), um eine erste, grobe lokale Zuordnung der Punkte in den Auftragungen der Scores (Abb. 6.20 b, d) zu den verschiedenen Orten auf der Probe zu ermöglichen.

Bei Verwendung des größeren Spektralbereichs ist eine eindeutige Trennung der SEHRS-Spektren aus den beiden diskreten Regionen durch eine Kombination von erster und zweiter Hauptkomponente möglich (Abb. 6.20 b). Die zugehörigen Loadings zeigen, dass die Banden bei 1587 cm^{-1} und 915 cm^{-1} für die Trennung wichtig sind (Abb. 6.20 c). Die gleichen Banden treten auch bei der PCA von Spektren der Farbstofflösungen in den Loadings auf, allerdings jeweils nur entweder in der ersten oder in der zweiten Hauptkomponente (Abb. 6.16 b), was dazu führt, dass die erste Hauptkomponente lokale Variationen der immobilisierten Silberpartikel unterscheidet, während die zweite Hauptkomponente die Spektren der beiden Farbstoffe unterscheidet (siehe Abschnitt 6.3). Die Tatsache, dass bei der MG/mix-Probe beide Banden für die Varianz in beiden Hauptkomponenten verantwortlich sind, zeigt, dass die intrinsischen lokalen Unterschiede der immobilisierten Silbernanopartikel sich hierbei nicht so eindeutig von den chemischen Unterschieden aufgrund der Verteilung der Analyten trennen lassen

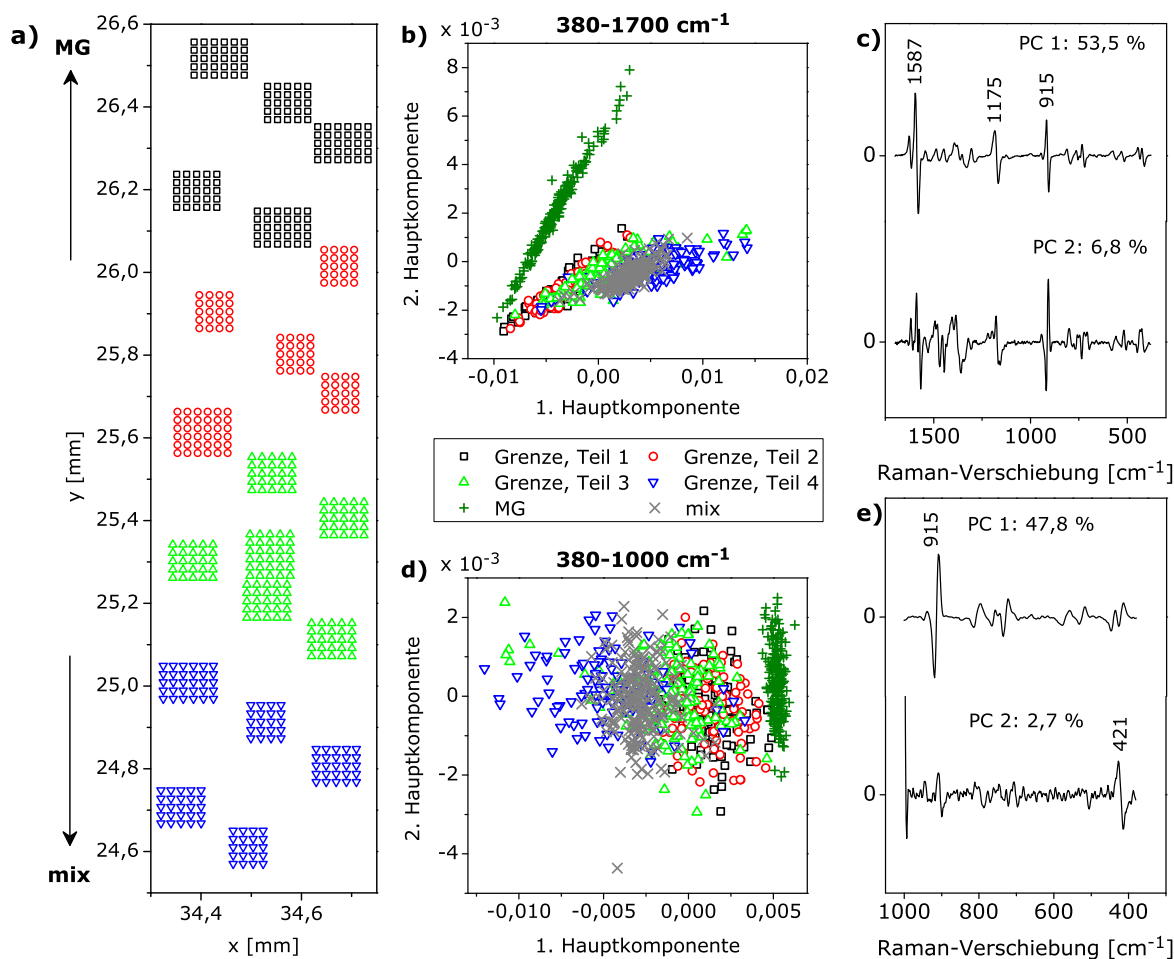


Abb. 6.20: (a) Darstellung des Messpunkterasters zur Untersuchung der Grenzregion der MG/mix-Probe. Die Pfeile zeigen, auf welcher Seite der Grenze sich die diskrete Malachitgrün- (MG) bzw. Mischregion (mix) befinden. (b) Scores und (c) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten (PC) einer PCA der SEIRS-Spektren aus der Grenzregion in (a) und aus der Malachitgrün- und Mischregion der MG/mix-Probe im Spektralbereich 380-1700 cm⁻¹. (d) Scores und (e) Loadings der ersten beiden PC einer PCA derselben Spektren wie in (b) und (c), aber unter Verwendung des Spektralbereichs 380-1000 cm⁻¹. In (c) und (e) sind die durch die jeweilige PC erklärten prozentualen Anteile an der Gesamtvarianz des Datensatzes angegeben.

wie bei der Betrachtung der Spektren der Lösungen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei den Lösungen bezüglich der Farbstoffe nur drei unterschiedliche Fälle existieren: reines Malachitgrün, reines Kristallviolett und eine Mischung im Verhältnis 1:1. Bei der MG/mix-Probe hingegen können in der Mischregion theoretisch alle denkbaren Mischungsverhältnisse der beiden Farbstoffe mit beliebig kleiner Abstufung vorliegen, was dazu führt, dass die Spektren aus dieser Region keine homogene Gruppe bilden. Außerdem gibt es aus der MG/mix-Probe naturgemäß keine reinen Kristallvio-

lettspektren, sodass der Datensatz insgesamt weniger auf den Unterschieden zwischen den beiden Farbstoffen basierende Varianz enthält als der in Abschnitt 6.3 betrachtete Datensatz. Dies verleiht den Unterschieden, die auf der Anordnung oder Oberflächenbeschaffenheit der Silberpartikel beruhen, mehr Gewicht. Bei Verwendung des kleineren Spektralbereiches wird dieser Einfluss geringer, sodass die Varianz der Bande bei 915 cm^{-1} , wie bei den Spektren der Lösungen, in der ersten Hauptkomponente repräsentiert ist (Abb. 6.20 e), was zu einer eindeutigen Trennung der Spektren aus den beiden diskreten Regionen entlang dieser Hauptkomponente führt (Abb. 6.20 d). Die Spektren aus der Grenzregion sind, unabhängig vom verwendeten Spektralbereich, in den Auftragungen der Scores in der Nähe der Spektren der Mischregion zu finden (Abb. 6.20 b, d). Allerdings ist, in Übereinstimmung mit der Erwartung aufgrund der Probenpräparation, eine größere Ähnlichkeit der Spektren aus dem oberen Teil der Grenzregion zu den Spektren der Malachitgrünregion beobachtbar (vgl. Abb. 6.20 a und Abb. 6.20 b, d).

Die entsprechende Analyse der SEHRS-Spektren der CV/mix-Probe zeigt ebenfalls eine große Ähnlichkeit der Spektren der Grenz- und Mischregionen dieser Probe (Abb. 6.21 b, d), wobei eine der erwarteten Analytverteilung entsprechende Tendenz in der Verteilung der Scores der Spektren aus der Grenzregion zu beobachten ist (vgl. Abb. 6.21 a und Abb. 6.21 b, d). Die Unterscheidung der Spektren aus den beiden diskreten Regionen der CV/mix-Probe (Kristallviolettregion bzw. Mischregion) erfolgt für beide Spektralbereiche ausschließlich entlang der ersten Hauptkomponente. Der Vergleich der Loadings (Abb. 6.21 c, e) zeigt jedoch, dass die Unterscheidung der Spektren, abhängig vom verwendeten Spektralbereich, verschiedene Ursachen hat.

Bei Verwendung des großen Spektralbereichs ist die größte Varianz in der Bande bei 1585 cm^{-1} zu finden (Abb. 6.21 c), bei Verwendung des kleinen Spektralbereiches jedoch in der Bande bei 915 cm^{-1} (Abb. 6.21 e). Die Varianz in der Bande bei 1585 cm^{-1} wurde bei den Spektren von Lösungen der Farbstoffe eher mit Unterschieden der immobilisierten Nanopartikel an sich in Verbindung gebracht als mit Unterschieden aufgrund der beiden Farbstoffe (siehe Abschnitt 6.3). Diese Vermutung wird nun dadurch bestätigt, dass bei der CV/mix-Probe in den Spektren aus der Kristallviolettregion für alle Banden größere Intensitäten beobachtet wurden als in der Mischregion. Diese verschiedenen Gesamtintensitäten der Spektren deuten auf quantitative Unterschiede in der Verstärkung der Hyper-Raman-Streuung durch die Nanopartikel hin. Diese muss ebenso wie die mit Hilfe der PCA identifizierten qualitativen Unterschiede der

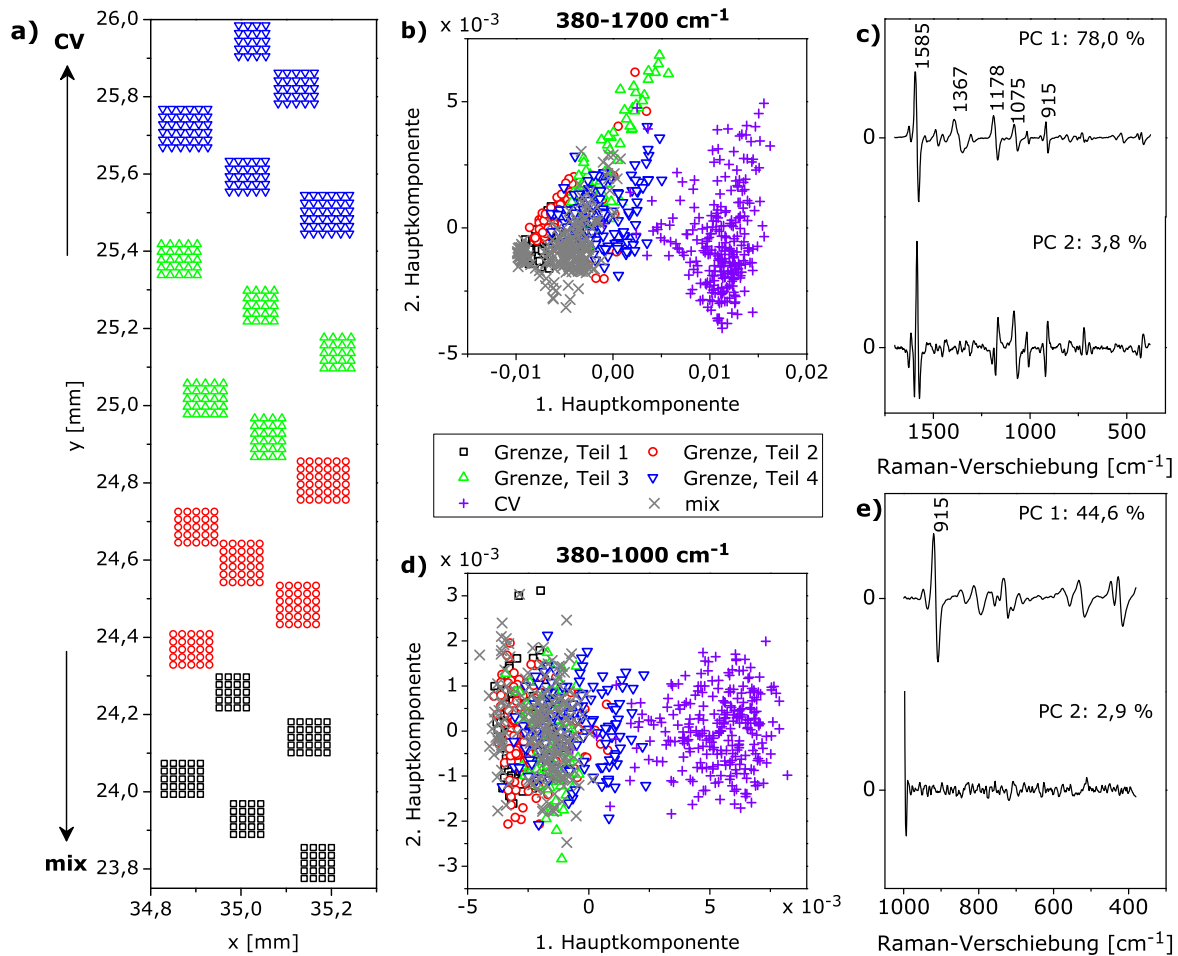


Abb. 6.21: (a) Darstellung des Messpunkterasters zur Untersuchung der Grenzregion der CV/mix-Probe. Die Pfeile zeigen, auf welcher Seite der Grenze sich die diskrete Kristallviolett- (CV) bzw. Mischregion (mix) befinden. (b) Scores und (c) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten (PC) einer PCA der SEIRS-Spektren aus der Grenzregion in (a) und aus der Kristallviolett- und Mischregion der CV/mix-Probe im Spektralbereich $380\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. (d) Scores und (e) Loadings der ersten beiden PC einer PCA derselben Spektren wie in (b) und (c), aber unter Verwendung des Spektralbereichs $380\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. In (c) und (e) sind die durch die jeweilige PC erklärten prozentualen Anteile an der Gesamtvarianz des Datensatzes angegeben.

Spektren durch Abweichungen zwischen den beiden Regionen in der Anordnung der Nanopartikel auf der Oberfläche oder in ihrer Wechselwirkung mit den Farbstoffen bedingt sein. Das Auftreten der Bande bei 915 cm^{-1} in den Loadings (Abb. 6.21 c) zeigt, dass dennoch ein Einfluss der Farbstoffverteilung auf die Spektren vorhanden ist, der bei Verwendung des kleineren Spektralbereichs in der PCA ein größeres Gewicht erhält (Abb. 6.21 e). Es sollte an dieser Stelle beachtet werden, dass diese erfolgreiche Unterscheidung der Spektren der CV/mix-Probe basierend auf der Verteilung der beiden

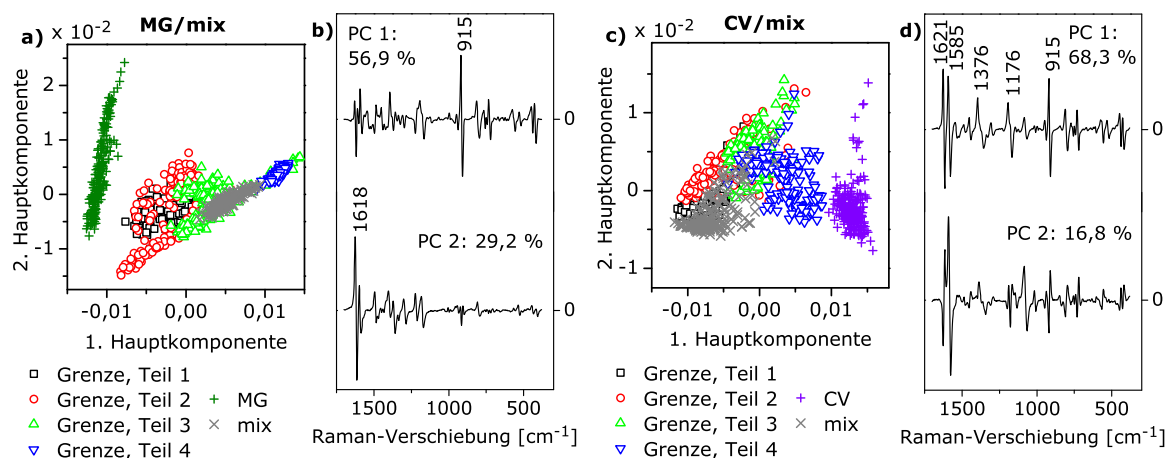


Abb. 6.22: (a) Scores und (b) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten einer PCA der SERS-Spektren, die parallel zu den in Abb. 6.20 untersuchten SEHRS-Spektren von der MG/mix-Probe gemessen wurden. (c-d) Analoge Daten für die CV/mix-Probe.

Farbstoffe nicht selbstverständlich ist, da Kristallviolett die Spektren seiner Mischung mit Malachitgrün dominiert (wie in Abb. 6.19 bzw. in Abb. 6.13 und Abb. 6.16 gezeigt) und somit die erwarteten Unterschiede zwischen Spektren der Kristallviolett- und der Mischregion sehr gering sind.

SERS-Spektren der MG/mix- und der CV/mix-Probe wurden quasisimultan mit den SEHRS-Spektren ungefähr an den gleichen Orten auf den Proben gemessen und ebenfalls mittels PCA untersucht. Da sich die Ergebnisse der PCA bei der Verwendung der beiden unterschiedlichen Spektralbereiche im Gegensatz zu den SEHRS-Datensätzen nicht wesentlich ändern und weil die SERS-Spektren der beiden Farbstoffe deutliche Unterschiede in mehreren Banden, die über den gesamten Spektralbereich verteilt sind, aufweisen, werden hier nur die Ergebnisse der PCA für den großen Spektralbereich diskutiert. Darin ist grundsätzlich eine eindeutige Trennung der Spektren aus der jeweiligen Mischregion von denjenigen aus der Malachitgrünregion (Abb. 6.22 a) bzw. Kristallviolettregion (Abb. 6.22 c) entlang der ersten Hauptkomponente erkennbar. Auch die Aufspaltung der Spektren aus den Grenzregionen entsprechend der erwarteten Analytverteilung auf der Probe ist für die SERS-Daten (Abb. 6.22 a, c) ebenso sichtbar wie für die SEHRS-Daten. Die größte Varianz im SERS-Datensatz besteht für die MG/mix-Probe in der Bande bei 915 cm^{-1} (Abb. 6.22 b). Bei der CV/mix-Probe ist diese Bande ebenfalls ein unterscheidendes Merkmal, ergänzt durch die Banden bei 1621 cm^{-1} und 1585 cm^{-1} (Abb. 6.22 d).

Die bis hierher diskutierten Untersuchungen der SEHRS- und SERS-Spektren der MG/mix- und der CV/mix-Probe zeigen, dass ortsabhängige Unterschiede in den Spektren sowohl aufgrund der Verteilung der Farbstoffe als auch aufgrund der Nanopartikelanordnung und der Silber-Molekül-Wechselwirkungen entstehen. Um herauszufinden, welcher dieser beiden Einflüsse größer ist, wurden für eine weitere Untersuchung die Spektren beider Proben sowie einer zusätzlichen Probe in einem Datensatz zusammengefasst. Für die zusätzliche Probe (im Folgenden als „mix-Probe“ bezeichnet) wurde ein Glasplättchen mit immobilisierten Silbernanopartikeln in eine Lösung getaucht, die Kristallviolett und Malachitgrün im Verhältnis 1:1 enthielt, sodass die resultierende Probe den Mischregionen der MG/mix- und CV/mix-Proben entsprechen sollte. Um festzustellen, wieviel Heterogenität innerhalb einer Probe auch ohne unterschiedliche Analyteinflüsse entsteht, wurden von der mix-Probe SEHRS- und SERS-Spektren in drei willkürlich gewählten, mehrere Millimeter voneinander entfernten Regionen gemessen.

Bei den Hauptkomponentenanalysen der SEHRS-Spektren der mix-Probe zusammen mit der MG/mix- und der CV/mix-Probe bilden die Spektren aus allen drei Regionen der mix-Probe eine Gruppe, während die Spektren der MG/mix- und CV/mix-Probe sich nach wie vor nach den Regionen aufteilen, und zwar entlang der ersten Hauptkomponente (Abb. 6.23 a). Die wichtigsten Banden für diese Unterscheidung sind die Banden bei 1585 cm^{-1} , 1175 cm^{-1} und 915 cm^{-1} (Abb. 6.23 b, oben), deren

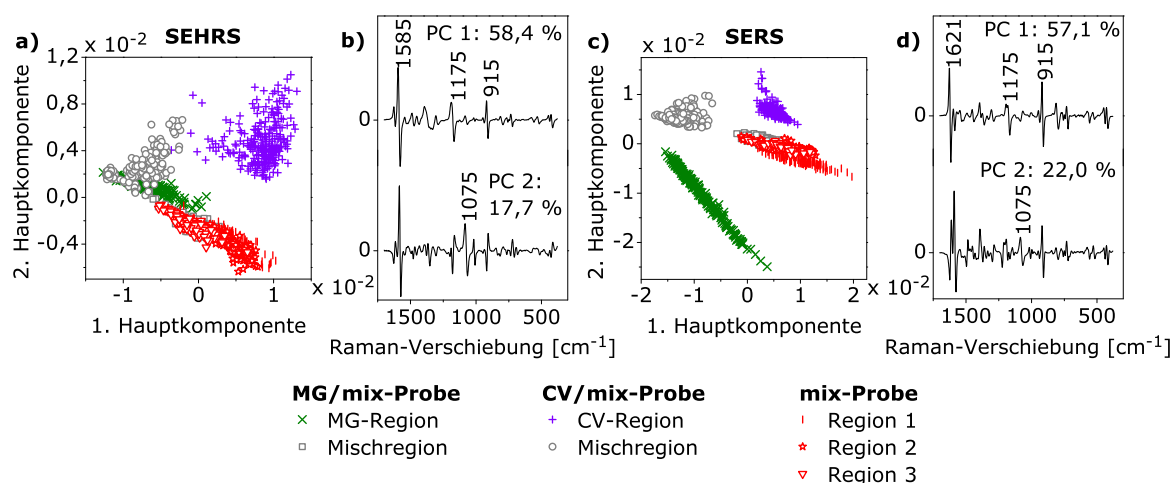


Abb. 6.23: (a) Scores und (b) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten (PC) der PCA der SEHRS-Spektren der MG/mix-, CV/mix- und mix-Probe. (c, d) Entsprechende Daten für die SERS-Spektren dieser Proben.

Bedeutung für die Unterscheidung der unterschiedlichen Regionen auch schon bei der Untersuchung der MG/mix-Probe (Abb. 6.20) und der CV/mix-Probe (Abb. 6.21) festgestellt wurde. Entlang der zweiten Hauptkomponente ist ansatzweise eine Trennung der drei unterschiedlichen Proben zu erkennen (Abb. 6.23 a). Insbesondere die Spektren der CV/mix-Probe sind entlang der zweiten Hauptkomponente von den Spektren der beiden anderen Proben getrennt, was auch anhand der Loadings dieser Hauptkomponente erkannt werden kann, die eine kleine Bande bei 1075 cm^{-1} aufweisen (Abb. 6.23 b, unten), wo die Spektren der CV/mix-Probe eine zusätzliche Bande haben, die keinem der beiden Farbstoffe zugeordnet werden kann (Abb. 6.19).

Für die SERS-Spektren ist das Ergebnis der PCA ähnlich: Durch eine Kombination von erster und zweiter Hauptkomponente lässt sich eine gedachte Linie bilden von Spektren der Malachitgrünregion der MG/mix-Probe über die Spektren der mix-Probe und der Mischregionen zu den Spektren der Kristallviolettregion der CV/mix-Probe (Abb. 6.23 c). Die Loadings dieser beiden Hauptkomponenten (Abb. 6.23 d) sind ähnlich wie im Fall der SEHRS-Spektren.

Auffällig ist, dass die Spektren aus der Mischregion der CV/mix-Probe, sowohl für den SEHRS- als auch für den SERS-Datensatz, zwar eindeutig von den Spektren der Kristallviolettregion derselben Probe getrennt sind, aber nicht in der Gruppe der Spektren aller anderen Mischregionen zu finden sind, sondern in Richtung der Spektren der Malachitgrünregion verschoben sind (Abb. 6.23 a, c). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Reihenfolge, in der die Proben bei der Präparation in die verschiedenen Farbstofflösungen eingetaucht werden, einen Einfluss auf das Mengenverhältnis der beiden Farbstoffe in der Mischregion hat. Für die Spektren von Lösungen der beiden Farbstoffe wurde festgestellt, dass Kristallviolett in einer äquimolaren Mischung einen größeren Einfluss auf die SEHRS- und SERS-Spektren hat als Malachitgrün (Abb. 6.16). In Übereinstimmung damit sind die Spektren der mix-Probe, auf die beide Farbstoffe zeitgleich aufgebracht wurden, und die Spektren aus der Mischregion der MG/mix-Probe, bei der Kristallviolett als zweiter Analyt aufgebracht wurde, bei Betrachtung der ersten Hauptkomponente näher an den Spektren der Kristallviolettregion als an denen der Malachitgrünregion (Abb. 6.23 a, c). Bei der Mischregion der CV/mix-Probe wurde Kristallviolett hingegen als erster Analyt aufgebracht, sodass teilweise eine Desorption und ein Austausch des Kristallvioletts durch die nachfolgende Malachitgrünlösung erfolgt sein kann, womit die anhand der Scores beobachtete Ähnlichkeit zu den Spektren der Malachitgrünregion der MG/mix-Probe (Abb. 6.23 a, c) erklärt werden kann.

Diese Beobachtungen bezüglich der Mischregionen und die Tatsache, dass die Unterscheidung von Malachitgrün- und Kristallviolettregion entlang der ersten Hauptkomponente erfolgt (Abb. 6.23 a), zeigen, dass grundsätzlich der Einfluss der Verteilung der Farbstoffe auf die Varianz der SEHRS-Spektren größer ist als der Einfluss der Heterogenität der Silbernanopartikeloberfläche innerhalb einer Probe bzw. der Unterschied zwischen zwei Proben. Dies wird auch deutlich anhand der hierarchischen Clusteranalyse eines noch größeren Datensatzes, in dem die in Abb. 6.23 untersuchten SEHRS-Spektren mit den SEHRS-Spektren von weiteren, ähnlich wie die MG/mix- und die CV/mix-Probe hergestellten Proben, und mit den SEHRS-Spektren von Lösungen der beiden Farbstoffe zusammengefasst sind (Abb. 6.24). In dieser Clusteranalyse bilden die Spektren aus Regionen und Lösungen, die nur einen der beiden Farbstoffe enthalten, zwei separate Cluster (Abb. 6.24). Spektren von gemischten Lösungen und Regionen mit beiden Farbstoffen sind auf diese beiden Cluster verteilt, wobei die Mehrzahl der Mischungsspektren eine größere Ähnlichkeit zu Kristallviolettspektren hat und daher mit diesen einen gemeinsamen Cluster bildet (Abb. 6.24).

Die PCA desselben Datensatzes wie in Abb. 6.24 unter Verwendung des großen Spektralbereichs zeigt ebenfalls, dass die Spektren der Kristallviolettregionen und -lösungen bzw. die Spektren der Malachitgrünregionen und -lösungen jeweils eine gemeinsame Gruppe bilden und die Spektren der Mischungen hauptsächlich in der Nähe derjenigen von Kristallviolett zu finden sind (Abb. 6.25 a). Die Trennung der beiden Farbstoffe findet jedoch in diesem Fall entlang der zweiten Hauptkomponente statt (Abb. 6.25 a), wobei die Loadings, wie bei der Betrachtung der einzelnen Proben, auf eine starke Varianz in der Bande bei 915 cm^{-1} hindeuten (Abb. 6.25 b). Die zweite Hauptkomponente erklärt 15,3 % der Gesamtvarianz des Datensatzes, was darauf hindeutet, dass die Unterschiede zwischen den Spektren der beiden verschiedenen Farbstoffe in diesem Fall eine untergeordnete Rolle für die Gesamtvarianz spielen. Zudem sind die Gruppen, die durch die beiden Farbstoffe gebildet werden, relativ breit gestreut und teilweise ist eine Trennung der unterschiedlichen Proben innerhalb einer Gruppe zu erkennen (Abb. 6.25 a). Verwendet man jedoch auch für die PCA dieses Datensatzes den kleineren Spektralbereich, wie in der HCA in Abb. 6.24, ist ein deutlicher Einfluss der Unterschiede zwischen Kristallviolett- und Malchitgrünspektren in der ersten Hauptkomponente zu erkennen (Abb. 6.25 c). Mit 46,2 % der Varianz des Datensatzes, die durch diese Hauptkomponente erklärt werden, hat der durch die beiden Farbstoffe verursachte Unterschied hier ein deutlich größeres Gewicht als bei der

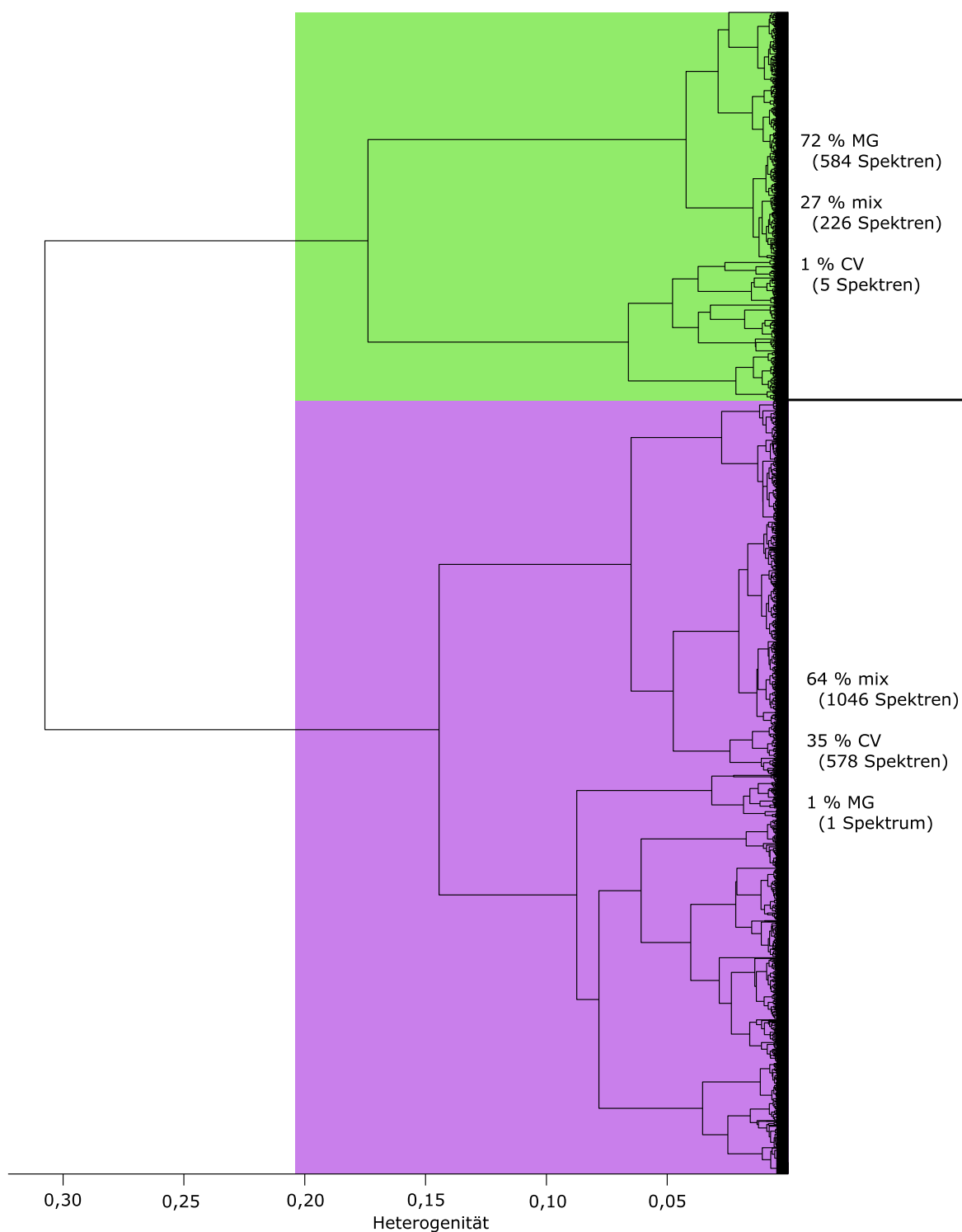


Abb. 6.24: Ergebnis einer hierarchischen Clusteranalyse der SEHRS-Spektren aus den Malachitgrün-, Kristallviolett- und Mischregionen der MG/mix-, CV/mix-, mix- und weiteren, ähnlich hergestellten Proben, sowie der SEHRS-Spektren von Lösungen der beiden Farbstoffe und ihrer Mischung. Verwendeter Spektralbereich: $380\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$.

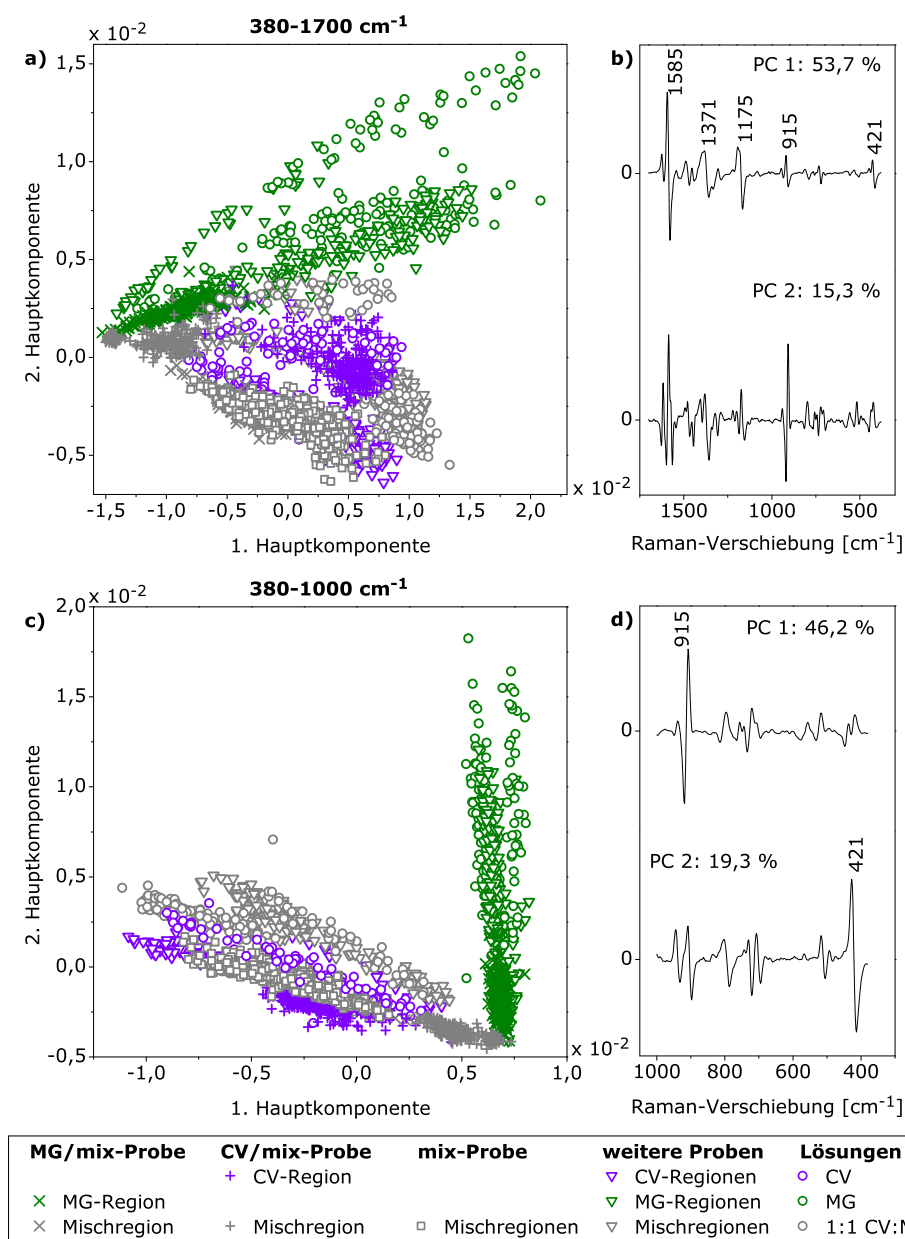


Abb. 6.25: (a) Scores und (b) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten einer PCA der SEIRS-Spektren aus den unterschiedlichen Regionen der MG/mix-, CV/mix-, mix- und weiterer, ähnlich hergestellter Proben, sowie der SEIRS-Spektren von Lösungen der beiden Farbstoffe und ihrer Mischung, Spektralbereich 380-1700 cm^{-1} . (c, d) Ergebnisse der PCA des gleichen Datensatzes unter Verwendung des Spektralbereichs 380-1000 cm^{-1} .

Verwendung des größeren Spektralbereichs.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Einfluss der strukturellen Unterschiede zwischen den beiden chemisch sehr ähnlichen Farbstoffen Malachitgrün und

Kristallviolett auf SEHRS-Spektren mit Hilfe von multivariaten Analysen eindeutig erkennbar ist. Dies ist auch bei Anwesenheit weiterer Einflüsse, wie der Anordnung und Oberflächenbeschaffenheit der immobilisierten Nanopartikel sowie der unterschiedlichen Wechselwirkung der Analytmoleküle mit der Silberoberfläche, möglich. Durch die Auswahl des Spektralbereiches, der in der PCA untersucht wird, und durch die Auswahl der Hauptkomponente, die betrachtet wird, kann zwischen den verschiedenen Einflüssen unterschieden werden. Dadurch ist es auch möglich, gezielt entweder ausschließlich die strukturellen Unterschiede der Analyten oder ausschließlich die Unterschiede in den Metall-Molekül-Wechselwirkungen zu betrachten.

6.4.3 Kartierung

Am Beispiel der MG/mix-Probe (Abb. 6.20) und der CV/mix-Probe (Abb. 6.21) konnte gezeigt werden, dass insbesondere innerhalb einer Probe chemisch verschiedene Regionen anhand ihrer SEHRS- und SERS-Spektren voneinander unterschieden werden können. Diese Erkenntnisse werden im Folgenden für die Bildgebung genutzt. Dazu werden für die SEHRS- bzw. SERS-Spektren beider Proben und mit beiden untersuchten Spektralbereichen jeweils die Scores der ersten Hauptkomponente betrachtet. Anhand der Scores der Spektren aus den jeweils zwei Regionen (Malachitgrün- und Mischregion bzw. Kristallviolett- und Mischregion) werden die Spektren, die an der Grenze zwischen diesen beiden Regionen aufgenommen wurden, in jeweils drei Gruppen unterteilt:

1. Spektren, die eindeutig der reinen Malachitgrün- bzw. Kristallviolettregion zugeordnet werden können, weil ihre Scores in einem Wertebereich liegen, der ansonsten nur Spektren dieser reinen Region enthält.
2. Spektren, die eindeutig der Mischregion zugeordnet werden können, weil ihre Scores in einem Wertebereich liegen, der ansonsten nur Spektren der Mischregion enthält.
3. Spektren, deren Scores Werte zwischen denen der beiden ersten Gruppen haben. Diese Spektren repräsentieren ebenfalls eine Mischung der beiden Farbstoffe, jedoch sind ihre Spektren denen der auf der jeweiligen Probe vorhandenen reinen Region ähnlicher als die unter 2. zusammengefassten Spektren.

Die resultierenden hyperspektralen Karten der untersuchten Grenzregionen zeigen für beide Proben sowohl für die SEHRS-Spektren als auch für die SERS-Spektren in beiden Spektralbereichen Verteilungen der Farbstoffe, die der Erwartung aufgrund der Probenpräparation entsprechen (Abb. 6.26). Für die MG/mix-Probe enthalten die oberen Teile der Karten hauptsächlich Punkte, die der reinen Malachitgrünregion zugeordnet werden können (grüne Punkte) oder deren Scores zwischen denen der Malachitgrün- und der Mischregion liegen (blaue Punkte), während in den unteren Teilen (von $y = 24,5$ mm bis ca. 25,0 mm) die meisten Punkte eindeutig der Mischregion zugeordnet werden können (Abb. 6.26 a-d). Die Karten der CV/mix-Probe zeigen insgesamt hauptsächlich Punkte, die eindeutig der Mischregion zugeordnet werden (graue Punkte), allerdings gibt es auch bei dieser Probe in der jeweils oberen Hälfte der Karten kleine Bereiche, deren Scores zwischen denen der Mischregion und denen der Kristallviolettregion liegen (blaue Punkte, Abb. 6.26 e-h). Bei den SEHRS-Spektren können in diesen Bereichen auch einige Spektren als reine Kristallviolettspektren klassifiziert werden (rote Punkte, Abb. 6.26 e, g).

Die Kartierung anhand der unterschiedlichen Spektrentypen (SEHRS bzw. SERS) und Spektralbereiche stimmt grundsätzlich untereinander und auch mit der aufgrund der Probenpräparation erwarteten Verteilung der Farbstoffe überein. Einzelne Punkte werden jedoch in den SEHRS-Karten und den SERS-Karten der identischen Probenausschnitte unterschiedlich klassifiziert. Dies zeigt das große Potential der Kombination von SEHRS- und SERS-Mikroskopie, komplementäre Informationen für die Bildgebung zu liefern. Die hier an Modellsystemen gezeigte Methodik kann in Zukunft auch auf andere Fragestellungen mit größerer praktischer Relevanz hinsichtlich der mikroskopischen Verteilung verschiedener Komponenten übertragen werden. Dazu müssten jeweils passende Referenzspektren in die Analyse der SEHRS- und SERS-Spektren der zu untersuchenden Proben einbezogen werden. Dann kann eine Klassifizierung der Spektren analog zu der hier durchgeführten willkürlichen Einteilung der Spektren der Grenzregionen in Gruppen anhand des Vergleichs mit Spektren, die weit entfernt von der Grenze in diskreten Regionen gemessen wurden, erfolgen. Für eine bessere Automatisierung der Klassifizierung verschiedener Gruppen kommt auch die Anwendung multivariater Regressionsverfahren in Betracht, die auf Raman- und SERS-Datensätze bereits erfolgreich angewandt wurden.^[211,212] Bei diesen wird, basierend auf den Referenzspektren, zunächst ein Modell konstruiert und im Anschluss werden die zu klassifizierenden Spektren anhand ihres Verhaltens zu diesem Modell untersucht.^[141,211]

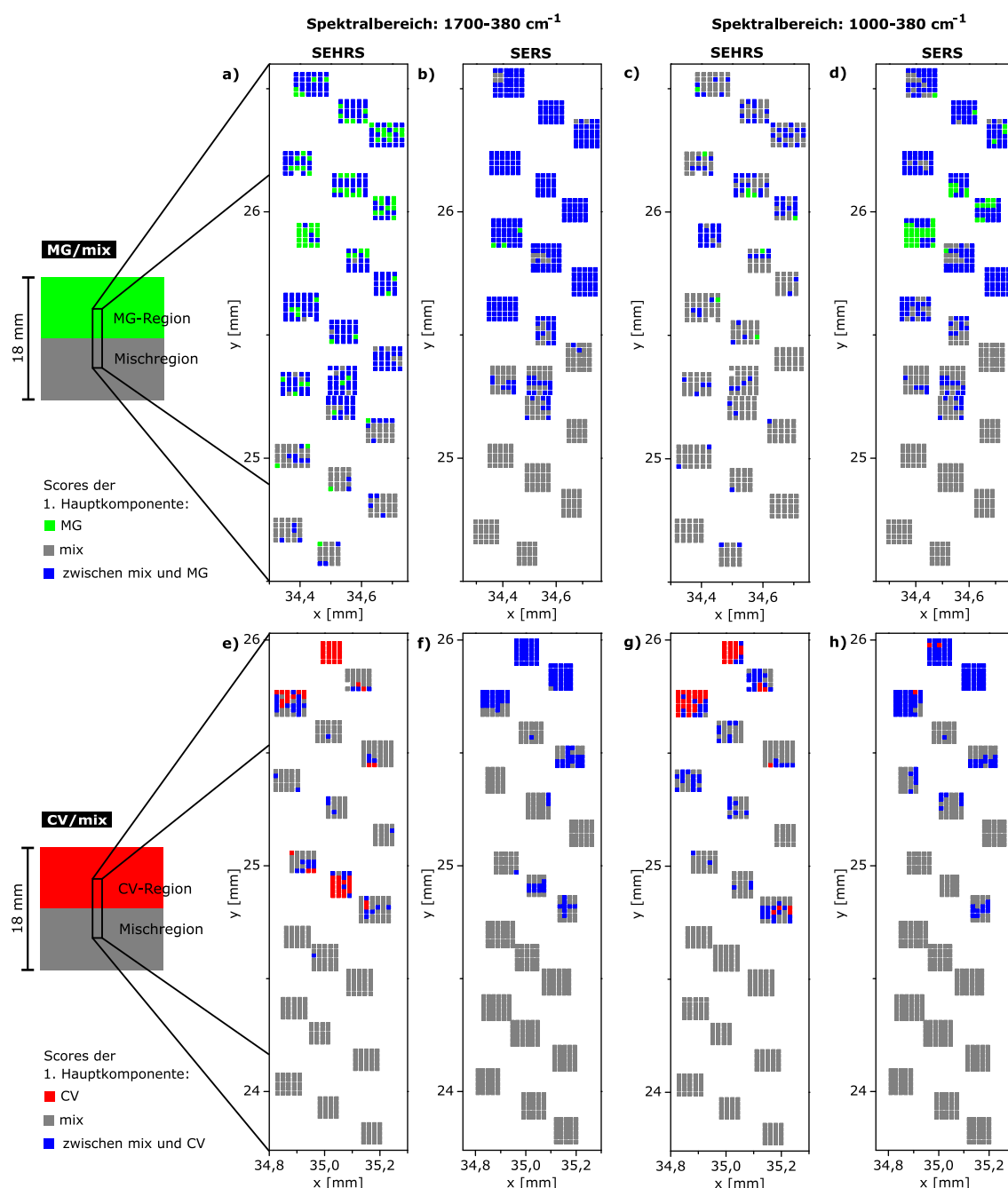


Abb. 6.26: Hyperspektrale Karten der untersuchten Grenzregionen (a-d) der MG/mix- und (e-h) der CV/mix-Probe. Die Farbgebung basiert auf den Scorewerten der ersten Hauptkomponente der PCA der SEHRS- (a, c, e, g) bzw. SERS-Spektren (b, d, f, h) der jeweiligen Probe. Untersucht wurden die Spektralbereiche von $380\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (a, b, e, f) und von $380\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (c, d, g, h). Auf der linken Seite sind schematisch die beiden Proben mit der erwarteten Verteilung der Farbstoffe dargestellt.

Kapitel 7

Einflüsse auf die Verstärkung im SEHRS- und SERS-Experiment

SEHRS und SERS in kolloidalen Lösungen sind komplexe Prozesse, die durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden. Insbesondere wird das Ausmaß der Verstärkung durch die Anzahl der Moleküle, die tatsächlich eine Wechselwirkung mit der Metalloberfläche eingehen und damit zum Signal beitragen können, entschieden. Einen Einfluss darauf haben z. B. die durch Konzentration und Größe der Nanopartikel bestimmte verfügbare Metalloberfläche oder die durch chemische Wechselwirkungen festgelegte Adsorptionsgeometrie. In diesem Kapitel werden diese Einflüsse durch eine übergreifende Diskussion der Beobachtungen aus den Experimenten mit *p*MBA (Kapitel 4) und Carotin (Kapitel 5) näher untersucht.

7.1 Elektromagnetische Verstärkung

Die theoretisch zu erwartende elektromagnetische Verstärkung in einem SEHRS- oder SERS-Experiment kann anhand der Extinktionsspektren der Silbernanostrukturen abgeschätzt werden.^[72,88] Durch den Vergleich mit den in Raman-Experimenten erhaltenen Verstärkungsfaktoren lassen sich daraus Informationen über die Anteile von elektromagnetischer und chemischer Verstärkung an der Gesamtverstärkung erhalten.^[88] Dies soll im Folgenden anhand der bei 1064 nm angeregten SEHRS- und SERS-Spektren von *p*MBA (Abb. 4.3 bzw. Abb. 4.7) und 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin (Abb. 5.10) gezeigt werden. Untersucht werden die Ringatemschwingungsbande von *p*MBA bei 1069 cm^{-1} (SEHRS) bzw. 1075 cm^{-1} (SERS) als Beispiel

für nicht-resonante Anregung und die C-C-Streckschwingungsbande von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin bei 1155 cm^{-1} als ein Beispiel für resonante SEHRS- und nicht-resonante SERS-Anregung. Da hier der Vergleich von SEHRS und SERS diskutiert werden soll und für die Abschätzungen der Verstärkungsfaktoren eine Reihe von Annahmen getroffen werden müssen, werden jeweils die Verhältnisse der Verstärkungsfaktoren im SERS- und SEHRS-Experiment betrachtet.

Das Verhältnis der Verstärkungsfaktoren EF_{SERS} und EF_{SEHRS} im SERS- bzw. SEHRS-Experiment lässt sich anhand von Gl. 7.1 aus Raman-Experimenten ermitteln. Dieser Wert beinhaltet sowohl elektromagnetische als auch chemische Beiträge zur Verstärkung.

$$\frac{EF_{\text{SERS}}}{EF_{\text{SEHRS}}} = \frac{I_{\text{SERS}}}{I_{\text{SEHRS}}} \cdot \frac{I_{\text{HRS}}}{I_{\text{RS}}} \quad (7.1)$$

Dabei müssen für die Intensitäten der untersuchten Banden in den SERS- und SEHRS-Spektren, I_{SERS} und I_{SEHRS} , die unterschiedlichen Detektorempfindlichkeiten und -quantenausbeuten¹ und die unterschiedlichen Integrationszeiten berücksichtigt werden. Für die Intensitäten in den Spektren des Carotinthiols müssen zusätzlich die unterschiedlichen Carotinthiolkonzentrationen im SEHRS- und SERS-Experiment berücksichtigt werden. Das Verhältnis der nicht-oberflächenverstärkten Hyper-Raman- und Raman-Intensitäten, I_{HRS} und I_{RS} , ist für *p*MBA nicht aus den vorliegenden Daten ermittelbar, es kann jedoch in Anlehnung an andere Experimente bei nicht-resonanter Anregung und vergleichbarer Anregungsintensität als $5 \cdot 10^{-6}$ angenommen werden.^[213] Für das Carotinthiol, bei dem ein Resonanzverstärkungsbeitrag in den Hyper-Raman-Spektren enthalten ist, wurde das Verhältnis I_{HRS} zu I_{RS} aus den Spektren des festen Carotinthiols (Abb. 5.7 a-b) ermittelt. Dabei wurden, ebenso wie für die SEHRS- und SERS-Intensitäten, die unterschiedlichen Integrationszeiten und Detektorempfindlichkeiten berücksichtigt. Die Anregungsintensitäten für die SEHRS- und Hyper-Raman-Spektren bzw. für die SERS- und Raman-Spektren unterschieden sich um etwa eine Zehnerpotenz. Da I_{HRS} quadratisch und I_{RS} linear von der Anregungsintensität abhängen, wurde somit das Verhältnis von I_{HRS} zu I_{RS} insgesamt mit einem Faktor von 10 multipliziert.

¹Laut Herstellerangaben werden bei der Detektion im CCD-Detektor (SEHRS) 1 Photon und bei der Detektion im InGaAs-Detektor (SERS) 75 Photonen als 1 count gemessen. Die Quantenausbeuten sind 91 % bei 532 nm (SEHRS) und 89 % bei 1064 nm (SERS). Daher wurden hier die Verhältnisse von I_{SERS} zu I_{SEHRS} mit einem Faktor von 73 multipliziert.

Das Verhältnis der theoretisch zu erwartenden elektromagnetischen Verstärkungen bei SERS und SEHRS, G_{SERS} und G_{SEHRS} , wurde unter Berücksichtigung von Gl. 2.3 und Gl. 2.4 (S. 22) aus den anhand der Extinktionsspektren zu erwartenden Feldverstärkungsfaktoren bei den Wellenzahlen der jeweiligen Anregungs- und Streustrahlung ermittelt (Gl. 7.2 und Gl. 7.3).^[72,88]

$$G_{SERS} = \frac{1}{q^2} \cdot \frac{|\epsilon(\bar{\nu}_0)|^2 |\epsilon(\bar{\nu}_{SERS})|^2}{\epsilon''(\bar{\nu}_0) \epsilon''(\bar{\nu}_{SERS}) \bar{\nu}_0 \bar{\nu}_{SERS}} \cdot A(\bar{\nu}_0) A(\bar{\nu}_{SERS}) \quad (7.2)$$

$$G_{SEHRS} = \frac{1}{q^3} \cdot \frac{|\epsilon(\bar{\nu}_0)|^4 |\epsilon(\bar{\nu}_{SEHRS})|^2}{\epsilon''(\bar{\nu}_0)^2 \epsilon''(\bar{\nu}_{SEHRS}) \bar{\nu}_0^2 \bar{\nu}_{SEHRS}} \cdot A(\bar{\nu}_0)^2 A(\bar{\nu}_{SEHRS}) \quad (7.3)$$

Dabei sind $\bar{\nu}_0$ die Wellenzahl der Anregungsstrahlung, $\bar{\nu}_{SERS} = \bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_M$ die Wellenzahl der SERS-Bande der Molekülschwingung $\bar{\nu}_M$ und $\bar{\nu}_{SEHRS} = 2 \cdot \bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_M$ die Wellenzahl der SEHRS-Bande (alle Wellenzahlen in cm^{-1}). Die komplexwertigen relativen Permittivitäten von Silber bei den Wellenzahlen von Anregungs-, SERS-, und SEHRS-Strahlung, $\epsilon(\bar{\nu}_0) = \epsilon'(\bar{\nu}_0) + i \epsilon''(\bar{\nu}_0)$, $\epsilon(\bar{\nu}_{SERS}) = \epsilon'(\bar{\nu}_{SERS}) + i \epsilon''(\bar{\nu}_{SERS})$ und $\epsilon(\bar{\nu}_{SEHRS}) = \epsilon'(\bar{\nu}_{SEHRS}) + i \epsilon''(\bar{\nu}_{SEHRS})$ wurden durch lineare Interpolation der Daten von Johnson und Christy^[214] erhalten. Die Extinktionen bei Anregungs- und SEHRS-Wellenzahlen, $A(\bar{\nu}_0)$ und $A(\bar{\nu}_{SEHRS})$, konnten direkt aus den Extinktionsspektren in Abb. 4.2 und Abb. 5.2 erhalten werden. Die SERS-Wellenzahlen entsprechen Wellenlängen von 1201 nm (*p*MBA) bzw. 1213 nm (Carotinthiol), außerhalb des gemessenen Spektralbereichs in den Extinktionsspektren. Da die Extinktion sich am Ende des gemessenen Spektralbereichs, bei 1200 nm, jedoch nur noch unwesentlich ändert, kann näherungsweise $A(\bar{\nu}_{SERS}) \approx A(1200 \text{ nm})$ angenommen werden. Der Volumenanteil an Silber q bei der Extinktionsmessung lässt sich unter der Annahme sphärischer Nanopartikel aus dem mittleren Partikeldurchmesser und der Partikelkonzentration ermitteln.

Das Verhältnis der SERS-Verstärkung zur SEHRS-Verstärkung liegt bei Ermittlung der Werte sowohl aus den Raman-Experimenten, die elektromagnetische und chemische Verstärkung repräsentieren, als auch aus den Extinktionsspektren, die nur die elektromagnetische Verstärkung repräsentieren, bei ca. 10^{-4} (Tabelle 7.1). Dies gilt sowohl für *p*MBA mit zwei verschiedenen Sorten von Silbernanopartikeln als auch ungefähr für 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin. Die Ähnlichkeit der Werte aus den Raman-Spektren und den Extinktionsspektren der jeweiligen Proben zeigt, dass die Unterschiede zwischen den absoluten Verstärkungen in SEHRS und SERS

Tabelle 7.1: Verhältnisse der Verstärkungsfaktoren bei SERS und SEHRS, ermittelt aus den Raman-Experimenten mit Anregung bei 1064 nm, und Verhältnisse der theoretischen elektromagnetischen Verstärkung bei SERS und SEHRS, ermittelt aus den Extinktionsspektren nach [72] und [88], für *p*MBA bei pH 7 und für 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin.

| | Ag (Citrat) | Ag (Hydroxylamin) | |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| | <i>p</i> MBA | <i>p</i> MBA | Carotinthiol |
| aus Raman-Spektren | | | |
| I_{SERS}/I_{SEHRS} | $2 \cdot 10^2$ | $2 \cdot 10^2$ | 4 |
| I_{HRS} / I_{RS} | $5 \cdot 10^{-6}$ [213] | $5 \cdot 10^{-6}$ [213] | $7 \cdot 10^{-4}$ |
| EF_{SERS} / EF_{SEHRS} | $8 \cdot 10^{-4}$ | $8 \cdot 10^{-4}$ | $3 \cdot 10^{-3}$ |
| aus Extinktionsspektren | | | |
| Partikeldurchmesser [nm] | 131 ± 29 | 42 ± 15 | 42 ± 15 |
| Partikelkonzentration [L^{-1}] | $8 \cdot 10^{11}$ | $4 \cdot 10^{13}$ | $4 \cdot 10^{13}$ |
| Ag Volumenanteil q | $1 \cdot 10^{-6}$ | $1 \cdot 10^{-6}$ | $1 \cdot 10^{-6}$ |
| G_{SERS} / G_{SEHRS} | $1 \cdot 10^{-4}$ | $4 \cdot 10^{-4}$ | $2 \cdot 10^{-4}$ |

hauptsächlich auf Unterschieden in der elektromagnetischen Verstärkung beruhen. Chemische Verstärkungseffekte haben dahingegen sowohl für *p*MBA, die kovalent an die Silberoberfläche bindet, als auch für das weniger fest gebundene Carotinthiol einen ähnlich großen Einfluss auf SEHRS und SERS. Eine exakte Berücksichtigung der Resonanzverstärkungsbeiträge in den oberflächenverstärkten und nicht-oberflächenverstärkten Spektren des Carotinthiols ist nicht möglich. Jedoch könnte das im Vergleich zu *p*MBA etwas größere Verhältnis von EF_{SERS} zu EF_{SEHRS} für das Carotinthiol darauf hindeuten, dass im SEHRS-Experiment eine Überlagerung der Plasmonen des Silbers mit dem elektronischen Übergang im Carotin zu einer Verringerung von Oberflächen- und/oder Resonanzverstärkung führt. Ein solcher Effekt wurde für resonante SERS-Spektren anderer chemischer Verbindungen bereits theoretisch und experimentell gezeigt^[30–32] und wurde für die SEHRS-Spektren von Carotin in Kapitel 5 anhand der relativen Bandenintensitäten diskutiert.

7.2 Salze und Nanopartikelkonzentration

SERS bei Anregung im sichtbaren Bereich ist, abgesehen von wenigen Ausnahmen (siehe Abschnitt 7.4), relativ robust gegenüber der Art und Konzentration der ver-

wendeten Nanopartikel (vgl. z. B. Abb. 5.3 und 5.6 b, in denen sich die Nanopartikelkonzentration um einen Faktor von 10 unterscheidet, oder Abb. 4.4 für verschiedene Arten von Nanopartikeln). Ebenso führt die Aggregation der Nanopartikel durch Salze, die der kolloidalen Nanopartikellösung zugegeben werden, zwar teilweise zu erheblich größeren Verstärkungsfaktoren, in vielen Fällen ist bei Anregung im sichtbaren Spektralbereich aber ein SERS-Experiment grundsätzlich auch ohne Aggregation der Nanopartikel möglich. Dahingegen sind bei Anregung mit 1064 nm, also weit entfernt von der optisch detektierbaren Plasmonenresonanz der Silbernanopartikel, sowohl die Art und Konzentration der zugegebenen Salze als auch die Konzentration der Nanopartikel selbst kritische Einflussfaktoren. Sie bestimmen die Art der Aggregate, die von den Nanopartikeln gebildet werden, und damit auch die Wechselwirkungen der Plasmonen. Daher können Salz- und Nanopartikelkonzentration ausschlaggebend dafür sein, ob in einem im nahen Infrarot angeregten SEHRS- oder SERS-Experiment überhaupt Signale des untersuchten Analyten erhalten werden. Da bei der Wechselwirkung der Nanopartikel untereinander aber auch chemische Effekte eine große Rolle spielen, sind die optimale Salz- und Nanopartikelkonzentration auch von den untersuchten Analyten abhängig und müssen für jedes Experiment angepasst werden. Diese Punkte sollen im Folgenden anhand von Beispielen aus den in den Kapiteln 4 und 5 beschriebenen Experimenten veranschaulicht werden.

Für alle SEHRS- und SERS-Experimente bei Anregung mit 1064 nm, die in dieser Arbeit diskutiert werden, wurden die kolloidalen Silbernanopartikel mit Hilfe von Salzen aggregiert, da ohne Salze bei dieser Anregungswellenlänge keine Signale der untersuchten Analyten erhalten werden konnten. Die Art der Salze ist jedoch unterschiedlich: Für Messungen von *p*MBA, die relativ stark an die Silberoberfläche bindet, wurde Natriumchlorid verwendet, während für die Messung der Carotine, die aufgrund der langen unpolaren Kette eine schwächere Wechselwirkung mit den Silbernanopartikeln eingehen, Magnesiumsulfat verwendet wurde. Diese beiden Salze wirken sich aufgrund der unterschiedlichen Ionenladungen^[180] unterschiedlich auf die Nanopartikel aus, da die divalenten Magnesiumkationen die negative Oberflächenladung der Silbernanopartikel effektiver abschirmen und somit leichter eine Aggregation der Nanopartikel hervorrufen können.^[181] Zwar führen beide Salze zur Aggregation der Nanopartikel und Messungen der dynamischen Lichtstreuung der entsprechenden Lösungen deuten tendenziell auf vergleichbare mittlere hydrodynamische Durchmesser der Aggregate zwischen 100 und 300 nm hin. Neben der Größe der Aggregate spielt vor allem ihre Morphologie,

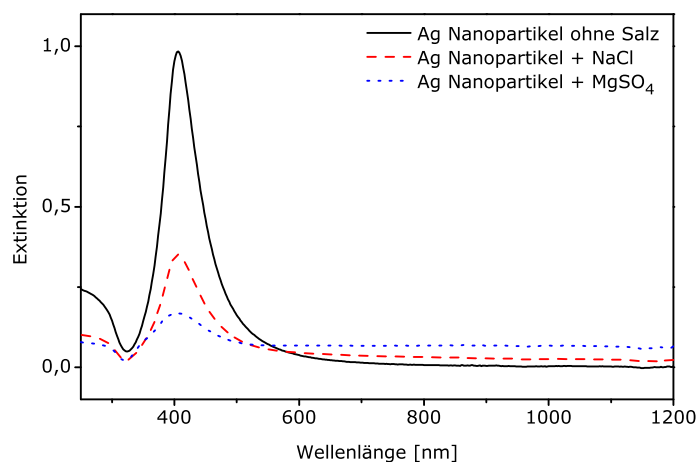


Abb. 7.1: Extinktionsspektren von durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Silbernanopartikeln ohne Salze und mit $9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NaCl bzw. MgSO_4 . Konzentration der Silbernanopartikel: $6 \cdot 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$.

insbesondere die Abstände zwischen den einzelnen Nanopartikeln, eine Rolle, sodass sich die plasmonischen Eigenschaften der Aggregate deutlich unterscheiden. So sind in den Extinktionsspektren der Silbernanopartikel in Gegenwart von MgSO_4 eine geringere Intensität des Extinktionsmaximums und eine höhere Intensität der erweiterten Plasmonenbande zu beobachten als in Gegenwart von NaCl (Abb. 7.1). Es ist also davon auszugehen, dass MgSO_4 eine vermehrte Aggregation der Nanopartikel hervorruft als NaCl und damit günstigere plasmonische Bedingungen ermöglicht. Ein wesentlicher Einfluss ergibt sich außerdem dadurch, dass die Sulfationen weniger stark an die Silberoberfläche binden als die Chloridionen und somit leichter durch Analytmoleküle ausgetauscht werden können.^[215] Vermutlich erklären diese beiden Effekte, dass MgSO_4 die Detektion von SEHRS- und SERS-Signalen von Carotin bei Anregung mit 1064 nm ermöglicht, NaCl aber nicht.

Ein weiterer Parameter, der insbesondere bei Verwendung von MgSO_4 für die Aggregation der Silbernanopartikel die SEHRS-Spektren beeinflusst, ist die Konzentration der Nanopartikel selbst. Werden durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellte Silbernanopartikel direkt in der Konzentration eingesetzt, die aus der Syntheseprozedur entsteht, und mit MgSO_4 aggregiert, so ist im SEHRS-Spektrum ein intensiver Untergrund zu beobachten (Abb. 7.2 a), der vermutlich auf Streueffekte zurückzuführen ist und der die Beobachtung der Analytsignale erschwert. Werden die untersuchten Lösungen jedoch nach der Zugabe von MgSO_4 und Analyt auf ein Zehntel der ursprünglichen Konzentration verdünnt, ist das Verhältnis von SEHRS-Signalen zu Un-

tergrund wesentlich günstiger (Abb. 7.2 b). Dahingegen ist bei SERS-Experimenten mit der gleichen Anregungswellenlänge der Untergrund bei der höheren Nanopartikelkonzentration zwar auch vorhanden, aber es sind dennoch deutliche Analytsignale zu beobachten (Abb. 5.4). Eine Verdünnung der Proben führt im Falle dieser SERS-Experimente im Gegensatz zu den SEHRS-Experimenten nicht zu einer Verbesserung, sondern dazu, dass die Banden des Analyten vollständig verschwinden. Scheinbar ist also für die bei 1064 nm angeregten SERS-Spektren eine Mindestkonzentration an Nanopartikeln bzw. -aggregaten erforderlich.

Zusammenfassend lässt sich hier feststellen, dass für die Experimente bei den verschiedenen Anregungsbedingungen sehr unterschiedliche Arten von Nanoaggregaten erforderlich sind. Dabei sind insbesondere die SEHRS-Experimente, aber auch die bei 1064 nm angeregten SERS-Experimente wesentlich empfindlicher als bei sichtbaren Wellenlängen angeregte SERS-Experimente. Über die genaue Morphologie der Nanoaggregate unter den verschiedenen Bedingungen ist jedoch wenig bekannt. Eine Charakterisierung der tatsächlich zum SEHRS- bzw. SERS-Signal beitragenden Nanoaggregate wäre hier in Zukunft wünschenswert. Für diesen Zweck wurden in den letzten Jahren korrelierte elektronenmikroskopische und SERS-/SEHRS-Untersuchungen vorgeschlagen.^[14,77] Damit ist auch eine weitergehende Charakterisierung der durch die Wechselwirkungen der Nanostrukturen innerhalb eines Aggregats geänderten plasmonischen Eigenschaften mit Hilfe von Elektronenenergieverlustspektroskopie möglich.^[15] Solche

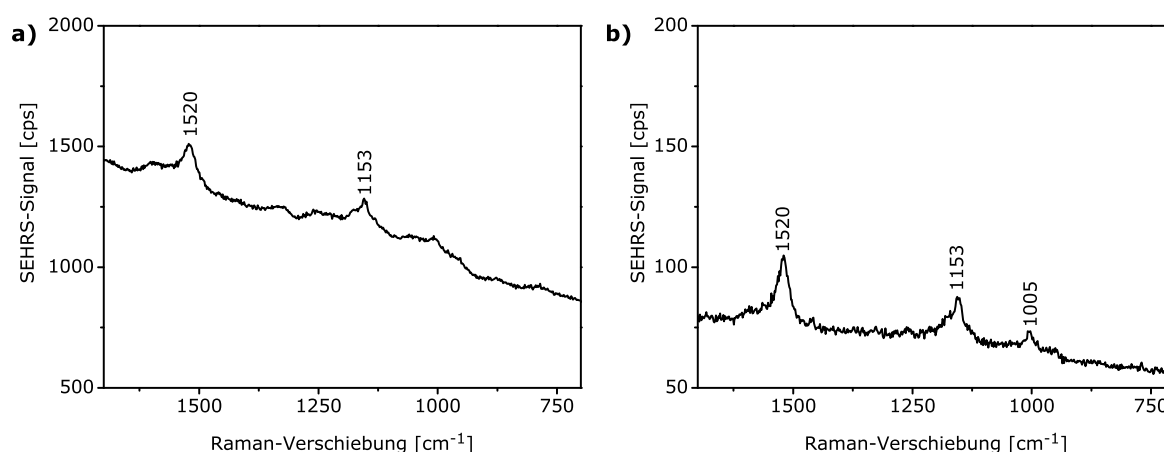


Abb. 7.2: SEHRS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)-β-carotin (Endkonzentration in der Lösung: $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) bei unterschiedlichen Konzentrationen der Silbernanoaggregate: (a) Silbernanopartikelkonzentration: $6 \cdot 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, MgSO_4 -Konzentration: $8 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (b) Silbernanopartikelkonzentration: $6 \cdot 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$, MgSO_4 -Konzentration: $9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Anregungswellenlänge: 1064 nm, maximale Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{28} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 30 s.

Untersuchungen basieren jedoch darauf, dass die Metallnanostrukturen auf einer Oberfläche fixiert sind, so dass Experimente in einem Elektronenmikroskop möglich sind. Die hier verwendeten Nanostrukturen in kolloidaler Lösung können hingegen so nicht direkt untersucht werden und aufgrund der Diffusion innerhalb der Lösungen während der Raman-Experimente kann mit den zur Zeit verfügbaren Methoden keine Aussage darüber getroffen werden, wie viele oder welche Aggregate zur Oberflächenverstärkung beitragen. Die hier gezeigten Ergebnisse ermöglichen jedoch in Zukunft eine gezielte Kontrolle der experimentellen Bedingungen, wie sie für analytische Anwendungen von SEHRS wichtig ist.

7.3 pH-Wert

In Kapitel 4 wurde diskutiert, dass in Abhängigkeit vom pH-Wert qualitative Veränderungen der SEHRS- und SERS-Spektren auftreten können, die auf Protonierung und Deprotonierung der Analytmoleküle und eine damit verbundene Änderung der Orientierung der Moleküle auf der Silberoberfläche zurückzuführen sind. Zusätzlich wurde für einige Nanopartikelsorten eine pH-Wert-Abhängigkeit der Gesamtintensität der Spektren, also der Oberflächenverstärkung, beobachtet. So haben insbesondere bei Verwendung der durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Silbernanopartikel alle SEHRS-Banden von *p*MBA bei extrem hohen bzw. niedrigen pH-Werten eine um einen Faktor von 2-3 geringere Intensität als bei neutralem pH-Wert (Abb. 4.3 b). Die bei 1064 nm angeregten SERS-Spektren von *p*MBA mit diesen und auch mit den durch Reduktion mit Citrat hergestellten Silbernanopartikeln zeigen eine damit vergleichbare Tendenz (Abb. 4.7). Dahingegen ist die Gesamtverstärkung in den bei 532 nm angeregten SERS-Spektren unabhängig vom pH-Wert (Abb. 4.4).

Auch SERS-Spektren anderer azider oder basischer Analyten zeigen ein ähnliches Verhalten, wobei der pH-Wert, bei dem die maximale Oberflächenverstärkung auftritt, vom pK_a -Wert der Analyten abhängig ist.^[93] Um derartige Effekte zu erklären, ist eine Betrachtung der an der Oberfläche der Nanopartikel adsorbierten Spezies und der Oberflächenladungen, sowie der Wechselwirkung zwischen den *p*MBA-Molekülen und der Metalloberfläche^[25] bzw. den stabilisierenden Spezies auf der Oberfläche^[216], erforderlich. Eine Veränderung der Oberflächenladung von Silbernanopartikeln infolge einer pH-Wert-Änderung ist grundsätzlich mit Hilfe von Zeta-Potentialmessungen beobachtbar.^[93] Allerdings sind die Schwankungen der gemessenen Zeta-Potentiale für

Tabelle 7.2: Mittlere Zeta-Potentiale (in mV) der Silbernanopartikel bei verschiedenen pH-Werten.

| | Ag (Citrat) | Ag (Hydroxylamin) | Ag (NaBH ₄ , II) |
|-------|-------------|-------------------|-----------------------------|
| pH 2 | -10 ± 17 | -8 ± 15 | -19 ± 24 |
| pH 7 | -13 ± 11 | -10 ± 12 | -16 ± 11 |
| pH 12 | -32 ± 17 | -23 ± 14 | -33 ± 12 |

die hier verwendeten, sehr polydispersen Nanopartikel, die zudem zum Teil in Aggregaten vorliegen, sehr groß, sodass sich allenfalls eine Tendenz zu einer stärker negativen Oberflächenladung in basischer Umgebung beobachten lässt (Tabelle 7.2). Durch Betrachtung der Protonierungsgleichgewichte für die beteiligten Spezies lassen sich jedoch zusätzliche Rückschlüsse ziehen.

Infolge der hier verwendeten Herstellungsmethoden sind an der Oberfläche der Nanopartikel hauptsächlich Citrat- bzw. Hydroxidionen vorhanden. Diese werden bei niedrigen pH-Werten protoniert und können dadurch, insbesondere im Falle der Hydroxidionen auf den durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Silbernanopartikeln,^[83] desorbieren. Damit wird die Oberflächenladung der Nanopartikel bei niedrigen pH-Werten weniger negativ, sodass die Nanopartikel destabilisiert werden und zu mehr Aggregation tendieren.^[93,185] Dies scheint auf den ersten Blick im Widerspruch zu den Extinktionsspektren zu stehen, die keine wesentliche pH-Abhängigkeit aufweisen (Abb. 4.2), allerdings können kleine Änderungen der Nanopartikelabstände in Extinktionsspektren unentdeckt bleiben, auch wenn sie zu großen Änderungen in den plasmonischen Eigenschaften^[87] der Nanoaggregate und damit zu deutlichen Änderungen der Verstärkungsfaktoren im SERS-Experiment führen.^[66] Eine solche Änderung der plasmonischen Eigenschaften, deren Auswirkung wellenlängenabhängig ist, erklärt auch die Tatsache, dass in den hier diskutierten Raman-Experimenten eine vom pH-Wert abhängige Oberflächenverstärkung nur bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm beobachtbar ist, nicht aber bei 532 nm.

Bei hohen pH-Werten sind alle stabilisierenden Spezies an der Nanopartikeloberfläche deprotoniert, was zu einer negativeren Oberflächenladung führt. Dies bedingt eine Abstoßung zwischen den Nanopartikeln und den bei hohen pH-Werten ebenfalls vollständig deprotonierten *p*MBA-Molekülen, sodass die für die Oberflächenverstärkung notwendige Wechselwirkung geringer wird.^[93,216] Beim Übergang zu neutralen Bedingungen wird die Bindung der *p*MBA-Moleküle an die Oberfläche demnach gestärkt,

während in sehr saurer Umgebung nicht nur die Carboxylgruppen von *p*MBA, sondern auch die an die Silberoberfläche gebundenen Thiolatgruppen teilweise protoniert werden können, was wiederum zu einer Schwächung der Wechselwirkung mit den Silbernanopartikeln und damit zu einer geringeren Verstärkung der Raman-Streuung führt.

7.4 Anregungswellenlänge

Der Einfluss der Anregungswellenlänge auf Raman- und Hyper-Raman-Spektren im Falle einer Resonanz mit einem elektronischen Übergang in den untersuchten Molekülen ist gut bekannt^[28,29,45] und wurde in dieser Arbeit anhand des Vergleichs von SEHRS, SERS und SERRS von Carotinoiden diskutiert (Kapitel 5). Im Falle der oberflächenverstärkten Raman-Streuung muss allerdings auch immer die relative Position der Anregungswellenlänge im Vergleich zur Plasmonenresonanz berücksichtigt werden. Verschiedene Untersuchungen haben in der Vergangenheit gezeigt, dass die Wellenlänge, bei der die maximale Plasmonenresonanz auftritt, oft nicht mit der Anregungswellenlänge korreliert, die für eine maximale Verstärkung im SERS-Experiment erforderlich ist.^[217,218] Oftmals können bei Anregung in der Nähe des Maximums der Plasmonenresonanz fast gar keine SERS-Signale erhalten werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei Anregung im Maximum der Plasmonenbande ein großer Teil der Raman-Streuung direkt von den Nanopartikeln reabsorbiert wird.^[219]

Im Folgenden soll das Verhalten der im Rahmen dieser Arbeit bereits umfassend charakterisierten Silbernanopartikel in SERS-Experimenten mit einer Anregungswellenlänge von 405 nm, also nah an der Plasmonenresonanz der Silbernanopartikel, untersucht werden. Als Testanalyten wurden *para*-Aminothiophenol (*p*ATP) und Adenin verwendet. Mit den Silbernanopartikeln, so wie sie mit den bekannten Herstellungsmethoden entstehen, konnten keine SERS-Signale beobachtet werden (Abb. 7.3, oberes Spektrum). Wird die kolloidale Nanopartikellösung vor der Zugabe der Analytlösung mit Wasser verdünnt und damit die Absorptionsintensität der Lösung verringert, können SERS-Spektren von *p*ATP beobachtet werden (Abb. 7.3), die den in der Literatur bekannten Spektren von *p*ATP^[220] bzw. von dessen photochemisch an der Silberoberfläche gebildetem Dimer *para*-Mercaptoazobenzen^[221] entsprechen. Für den Grad der Verdünnung muss ein Kompromiss gefunden werden zwischen einer Nanopartikelkonzentration, die niedrig genug ist um die Reabsorption zu vermeiden, und einer Nanopartikelkonzentration, die hoch genug ist, damit eine ausreichende Anzahl von

Analytmolekülen von der Feldverstärkung profitieren kann. Für die durch Reduktion mit Citrat hergestellten Silbernanopartikel ergeben sich mit *p*ATP die intensivsten Signale bei einer Verdünnung in Volumenverhältnissen von 1:4 bis 1:7 (Abb. 7.3). Für eine geringere *p*ATP-Konzentration wurden bei einer Verdünnung von 1:4 die intensivsten SERS-Signale beobachtet (Abb. 7.4).

Auch für die Silbernanopartikel, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurden, ermöglicht die Verringerung der Nanopartikelkonzentration die Detektion von SERS-Signalen von *p*ATP (Abb. 7.5).

*p*ATP bindet aufgrund der Thiolgruppe sehr gut an die Silbernanopartikel. Zudem haben *p*ATP-Moleküle aufgrund der *para*-Anordnung von Thiol- und Aminogruppe

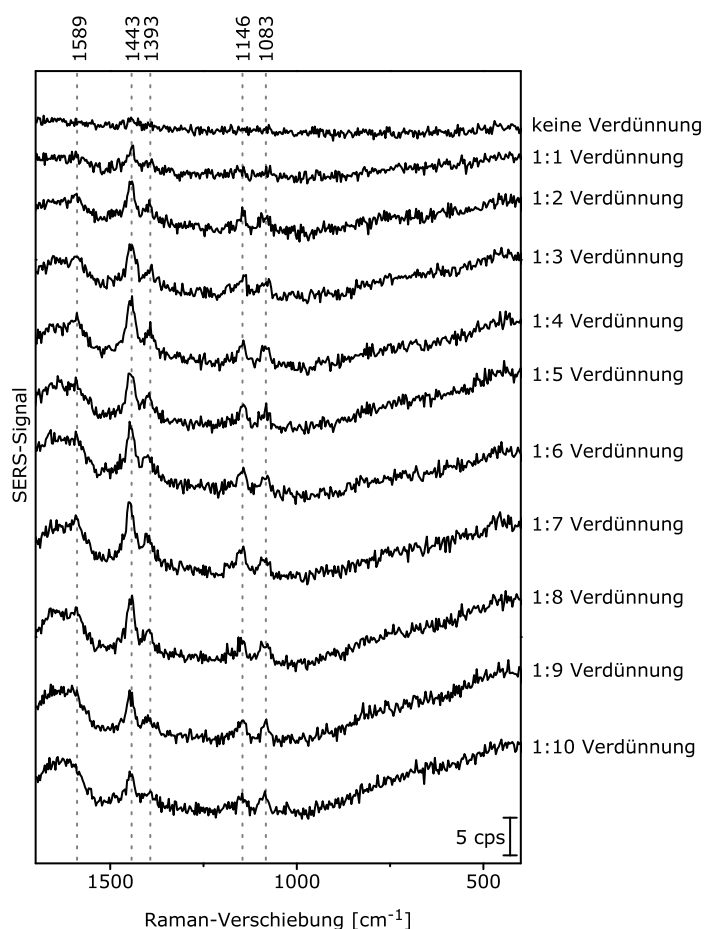


Abb. 7.3: SERS-Spektren von *p*-Aminothiophenol ($9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden, bei verschiedenen Nanopartikelkonzentrationen. Anregungswellenlänge: 405 nm, Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{22} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 1 s. Jedes Spektrum ist ein Mittelwert aus jeweils 20 Spektren derselben Probe.

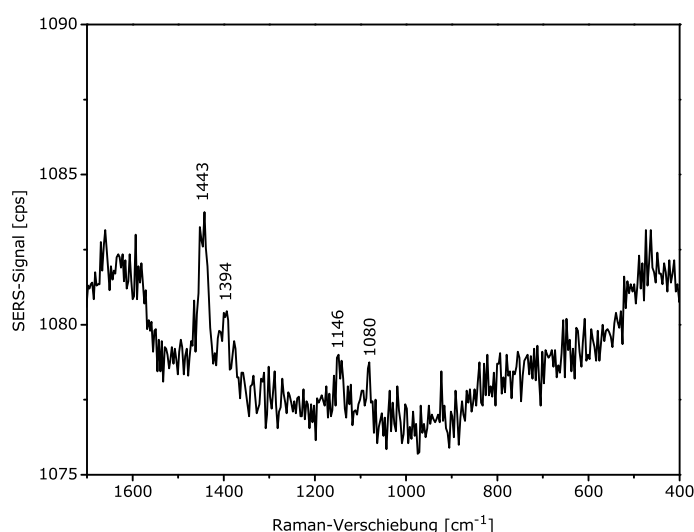


Abb. 7.4: SERS-Spektrum von *p*-Aminothiophenol ($9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden. Die kolloidale Nanopartikellösung wurde im Verhältnis 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt. Anregungswellenlänge: 405 nm, Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{22} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 1 s. Mittelwert aus 20 Spektren derselben Probe.

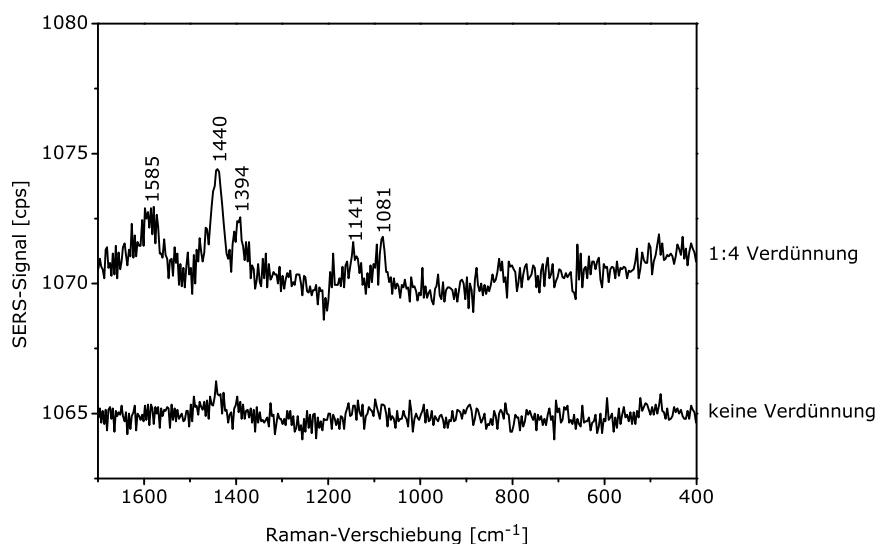


Abb. 7.5: SERS-Spektren von *p*-Aminothiophenol ($9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurden. Die kolloidale Nanopartikellösung wurde für das untere Spektrum unverdünnt eingesetzt und für das obere Spektrum im Verhältnis 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt. Anregungswellenlänge: 405 nm, Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{22} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 1 s. Die Spektren sind Mittelwerte von jeweils 20 Spektren einer Probe.

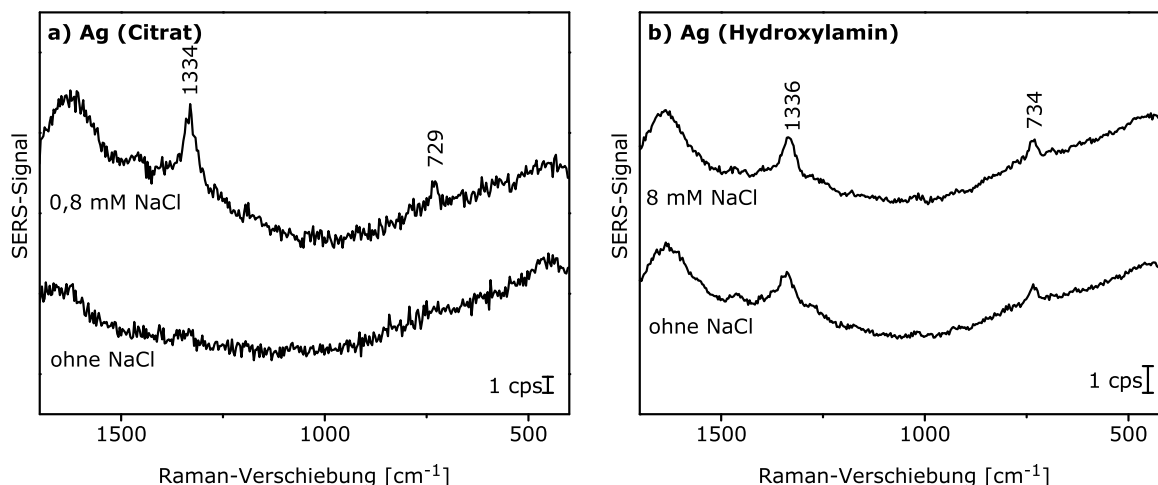


Abb. 7.6: SERS-Spektren von Adenin ($8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit (a) Citrat bzw. (b) Hydroxylamin hergestellt wurden. Beide Sorten der kolloidalen Nanopartikellösungen wurden im Verhältnis 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt, bevor die Adeninlösung und unterschiedliche Konzentrationen von NaCl zugegeben wurden. Anregungswellenlänge: 405 nm, Photonenflussdichte: $6 \cdot 10^{22} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 20 s. Die Spektren in (b) sind jeweils Mittelwerte aus 20 Spektren.

ein hohes Potential, Silbernanopartikel durch chemische Wechselwirkung miteinander zu verknüpfen, so dass die Abstände zwischen den einzelnen Nanopartikeln sehr klein werden und eine zusätzliche Feldverstärkung erzielt werden kann.^[222] Adenin hingegen bindet schwächer an die Silbernanopartikel und lässt sich daher schlechter detektieren. Im Falle der durch Reduktion mit Citrat hergestellten Silbernanopartikel reicht für Adenin eine Verringerung der Reabsorption durch Verdünnung der kolloidalen Lösung nicht aus, sondern es muss zusätzlich Aggregation der Nanopartikel durch Zugabe von Natriumchlorid induziert werden, wobei allerdings schon eine sehr geringe Menge an NaCl ausreicht (Abb. 7.6 a). Mit den durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Silbernanopartikeln können schon ohne NaCl SERS-Signale von Adenin erhalten werden, deren Intensität bei Zugabe von NaCl nicht zunimmt (Abb. 7.6 b). Dies lässt sich damit begründen, dass bei der Herstellung der Nanopartikel mit Hydroxylamin keine stabilisierenden Moleküle, wie das Citrat bei den anderen Silbernanopartikeln, vorhanden sind, sodass die Stabilisierung dieser Nanopartikel ausschließlich durch die Oberflächenladung gegeben ist. Damit können sie auch mit einem weniger stark bindenden Analyten wie Adenin aggregieren, ohne dass zusätzliche Ionen zugesetzt werden. Auffällig an den hier erhaltenen Spektren ist, dass die Ringatemschwingungsbande von Adenin bei ca. 730 cm^{-1} , die sonst in SERS-Spektren von Adenin oftmals

die intensivste Bande ist (siehe z. B. [196] und Abb. 6.6 a), im Vergleich zur C-N-Streckschwingungsbande bei 1334 cm^{-1} eine relativ geringe Intensität hat. Dies könnte auf eine geänderte Orientierung der Adeninmoleküle auf der Silberoberfläche aufgrund des geringeren Konzentrationsverhältnisses von Nanopartikeln zu Molekülen hindeuten.

Eine weitere Verbesserung ergibt sich, wenn die Silbernanopartikel nicht in kolloidaler Lösung verwendet werden, sondern mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) auf einer Glasoberfläche immobilisiert werden. Das Extinktionsmaximum der immobilisierten Silbernanopartikel ist gegenüber dem der kolloidalen Lösung blauverschoben (Abb. 7.7). Dies deutet darauf hin, dass aus der polydispersen Mischung der Silbernanopartikel auf der Oberfläche vor allem die kleineren Partikel einzeln vorliegen. Durch die Blauverschiebung des Extinktionsmaximums bei der Immobilisierung der Nanopartikel liegt die Anregungswellenlänge von 405 nm nicht mehr auf der kurzwelligen Seite des Extinktionsmaximums wie bei der kolloidalen Lösung, sondern auf der langwelligen Seite, sodass die Raman-Streuung weiter vom Extinktionsmaximum entfernt ist und weniger reabsorbiert werden kann. Gleichzeitig zeigt die intensive erweiterte Plasmonenbande im Spektrum der immobilisierten Nanopartikel (Abb. 7.7), dass auf der Oberfläche auch Aggregate gebildet werden, die zu einer höheren Feldverstärkung führen können.

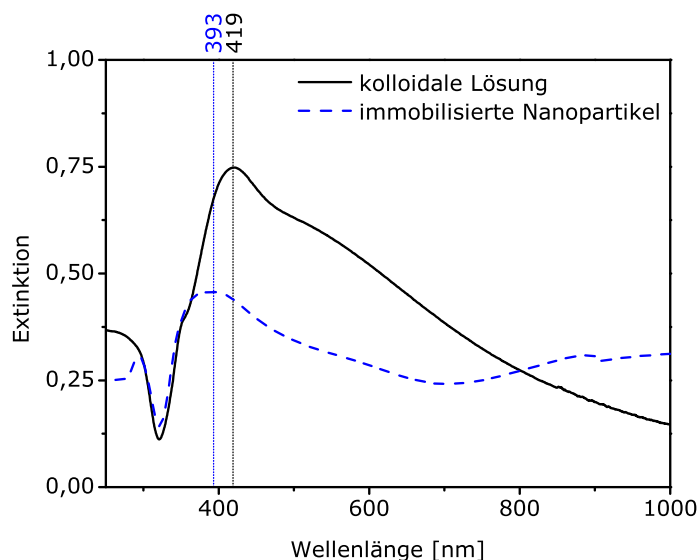


Abb. 7.7: Extinktionsspektren von Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden, in kolloidaler Lösung und immobilisiert auf einer Glasoberfläche.

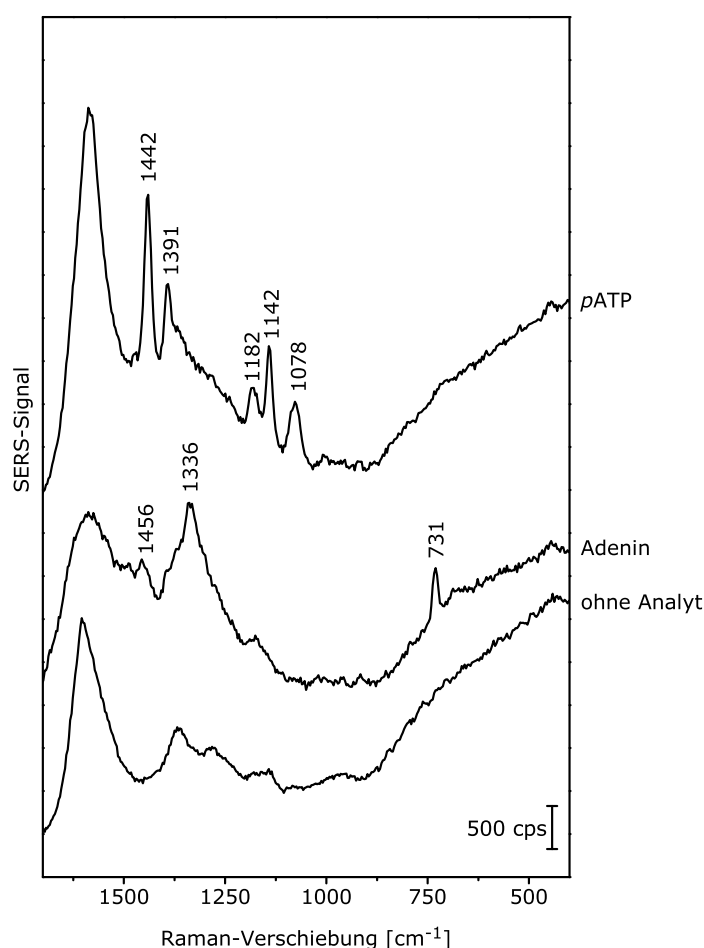


Abb. 7.8: SERS-Spektren von *p*-Aminothiophenol ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, oberes Spektrum) und Adenin ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, mittleres Spektrum) auf immobilisierten Silbernanopartikeln, sowie das Spektrum der immobilisierten Silbernanopartikel ohne Analyten (unteres Spektrum). Anregungswellenlänge: 405 nm, Photonenflussdichte: $2 \cdot 10^{24} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Integrationszeit: 1 s.

Tatsächlich zeigen SERS-Spektren von *p*ATP und Adenin auf den immobilisierten Silbernanopartikeln bei gleicher Analytkonzentration deutlich intensivere Signale als in den kolloidalen Lösungen (vgl. Abb. 7.8 und Abb. 7.3 bzw. 7.6). Allerdings sind intensive Untergrundsignale beobachtbar (Abb. 7.8), die mit vergleichbaren Proben bei anderen Anregungswellenlängen nicht beobachtet wurden. Um diese zu vermeiden müssten weitere Optimierungen der experimentellen Bedingungen erfolgen.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle feststellen, dass die bei Anregung nah am Maximum der Plasmonenresonanz der Silbernanostrukturen erhaltenen SERS-Signale wesentlich geringer sind als bei anderen Anregungswellenlängen. Die Signalintensität im SERS-Experiment wird demnach entscheidend durch die Anregungswel-

lenlänge beeinflusst. Wie die in diesem Abschnitt dargestellten Experimente gezeigt haben, kann die Reabsorption der Raman-Streuung durch die Nanostrukturen durch eine Optimierung der Silbernanopartikellkonzentration minimiert werden. Diese und die in den vorangegangenen Abschnitten gewonnenen Erkenntnisse tragen entscheidend dazu bei, die experimentellen Bedingungen im SERS- bzw. SEHRS-Experiment gezielt zu kontrollieren, um reproduzierbare analytische Anwendungen zu ermöglichen.

Kapitel 8

Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein tieferes Verständnis von oberflächenverstärkter Hyper-Raman-Streuung (engl. *surface-enhanced hyper-Raman scattering*, SEHRS) zu erlangen, insbesondere im Hinblick auf zukünftige reproduzierbare analytische Anwendungen. Dazu wurden Experimente mit verschiedenen chemischen Verbindungen, adsorbiert an Silbernanostrukturen, durchgeführt. Zur Untersuchung der Einflüsse von Resonanzverstärkung auf die SEHRS-Spektren wurden ein thiolfunktionalisiertes Carotin, 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin, als Beispiel für resonante Anregung und *para*-Mercaptobenzoessäure (*p*MBA), deren SEHRS- und SERS-Spektren zusätzlich abhängig vom pH-Wert sind, als Beispiel für nicht-resonante Anregung betrachtet. Basierend auf den Erkenntnissen über die Wechselwirkungen dieser einzelnen Analyten mit den Silberoberflächen in den SEHRS- und SERS-Experimenten wurden anschließend komplexere Systeme, verschiedene mikrostrukturierte plasmonische Oberflächen betrachtet. An diesen wurde die hyperspektrale SEHRS-Bildgebung demonstriert.

Die Experimente wurden an identischen Proben in kurzer zeitlicher Abfolge in einem gemeinsamen mikrospektroskopischen Aufbau mit Anregungswellenlängen von 1064 nm (SEHRS und SERS) und 532 nm (SERS) durchgeführt, sodass eine einfache Vergleichbarkeit der Spektren gewährleistet ist. Für alle untersuchten Systeme konnte gezeigt werden, dass SEHRS und vor allem die Kombination der Informationen dieser drei Anregungsbedingungen eine umfassende Charakterisierung der Systeme ermöglicht. Insbesondere lassen sich durch die Kombination von SEHRS- und SERS-Spektren mehr Informationen über die Metall-Molekül-Wechselwirkungen gewinnen als aus SERS-Spektren allein. Dies ist auf die unterschiedlichen Symmetrieaus-

wahlregeln und die damit einhergehenden komplementären Informationen, die aus den ein- und zweiphotonenangeregten SERS-Spektren erhalten werden, auf unterschiedliche Einflüsse der plasmonischen Eigenschaften der Silbernanostrukturen bei den verschiedenen Wellenlängen und im Falle der Carotine auch auf Einflüsse der elektronischen Übergänge der untersuchten Moleküle zurückzuführen.

Anhand von Untersuchungen der SEHRS-Spektren und SERS-Spektren von *p*MBA in Abhängigkeit vom pH-Wert mit verschiedenen Sorten von Silbernanopartikeln, die sich in Größe, Morphologie und Oberflächeneigenschaften unterscheiden, wurden systematische Untersuchungen und Vergleiche des Verhaltens dieser Nanostrukturen bei den verschiedenen Anregungsbedingungen durchgeführt. Diese haben gezeigt, dass SEHRS und SERS bei Anregung im nahen Infrarot, bei 1064 nm, wesentlich empfindlicher auf Unterschiede in den Eigenschaften der Nanostrukturen reagieren als SERS bei Anregung im sichtbaren Spektralbereich, bei 532 nm. Bei Auswahl passender Nanostrukturen lassen sich insbesondere aus den SEHRS-Spektren Informationen über die Wechselwirkungen und Adsorptionsgeometrien von *p*MBA an den Silberoberflächen gewinnen. Die bei 1064 nm angeregten SERS-Spektren ermöglichen, basierend auf bisher wenig untersuchten Banden von *p*MBA bei relativ kleinen Raman-Verschiebungen, eine ebenso robuste Unterscheidung lokaler pH-Werte wie die bisher für pH-Messungen vorgeschlagenen SERS-Spektren bei kürzeren Anregungswellenlängen. Durch die Anregungswellenlänge von 1064 nm ergeben sich allerdings in Zukunft aufgrund der höheren Eindringtiefe und der geringeren Photonenenergie mehr Anwendungsmöglichkeiten im Hinblick auf empfindliche biologische Proben.

SERS-Experimente mit Carotinoiden, insbesondere β -Carotin, sind schwierig umzusetzen, da das unpolare β -Carotin nur wenige Wechselwirkungsmöglichkeiten mit Metallnanopartikeln in wässriger Umgebung hat. Das thioolfunktionalisierte Carotin kann (über die Thiolgruppe oder den ebenfalls durch die Funktionalisierung zusätzlich eingeführten Phenylring) eine stärkere Wechselwirkung mit Silbernanoartikeln eingehen. Das führt zu höheren Oberflächenverstärkungen in SERS-Experimenten und ermöglicht somit erstmals nicht-resonante SERS-Spektren eines β -Carotins in verdünnten wässrigen Lösungen. Damit kann der Einfluss des elektronischen Übergangs des Carotins, der bei Experimenten mit festem Carotin auch bei nicht-resonanter Anregung die Raman-Spektren dominiert, minimiert werden, sodass andere Strukturinformationen erhalten werden. Die SEHRS-Spektren der Carotine liefern noch weitere Informationen, was insbesondere am Auftreten einiger IR-aktiver Banden, die in

SERS-Spektren symmetrieverboten sind, deutlich wird. Der Vergleich der resonant angeregten SEHRS- und SERS-Spektren der Carotinoide zeigt die unterschiedlichen Einflüsse von Oberflächen- und Resonanzverstärkung und weist insbesondere auf eine elektronische und/oder elektromagnetische Kopplung der Carotinoide und der Silbernanostrukturen hin. Um diese Effekte noch näher zu untersuchen, wären in Zukunft SEHRS-Anregungsprofile der hier untersuchten Systeme interessant.

SEHRS-Spektren enthalten eine Vielzahl spezifischer Strukturinformationen aus einem lokal sehr begrenzten Probevolumen. Um diese für analytische Zwecke nutzbar zu machen, wurden in dieser Arbeit anhand verschiedener einfach strukturierter plasmonischer Oberflächen grundlegende Untersuchungen zur Bildgebung durchgeführt. Diese beinhalteten die Etablierung entsprechender experimenteller Bedingungen einerseits und die Nutzbarmachung der hyperspektralen Daten andererseits. Insbesondere hervorzuheben ist hier ein System aus auf Glasoberflächen immobilisierten Silbernanopartikeln mit einer definierten Verteilung verschiedener Farbstoffe. Anhand dieses Systems konnten die multivariate Unterscheidung der Farbstoffe anhand ihrer SEHRS-Spektren und die Analyse der lokalen Verteilung der Farbstoffe auf der Oberfläche durch hyperspektrale SEHRS-Bildgebung gezeigt werden. Des weiteren wurde festgestellt, dass sich anhand einer Hauptkomponentenanalyse der SEHRS-Spektren dieses Systems, in Abhängigkeit von der Auswahl des Spektralbereiches und der betrachteten Hauptkomponente, entweder die strukturellen Unterschiede der Farbstoffe oder die Eigenschaften der plasmonischen Oberfläche bzw. die lokal unterschiedlichen Molekül-Metall-Wechselwirkungen untersuchen lassen. Damit liefert SEHRS umfassendere Informationen über die Verteilung der verschiedenen Moleküle auf der Oberfläche als SERS. Diese Erkenntnisse können zukünftig auf Fragestellungen hinsichtlich Analytverteilungen und Wechselwirkungen in realen Proben übertragen werden und könnten dabei mit multivariaten Regressionsverfahren optimiert werden.

Zusammenfassend zeigen die vorgestellten Experimente, dass die Voraussetzungen für eine analytische Anwendung von SEHRS – die Fähigkeit, hyperspektrale Kartierungen anhand der Spektren durchzuführen und die Möglichkeit, auch bei nicht-resonanter Anregung Spektren zu erhalten – erfüllt sind. Im Hinblick auf reproduzierbare Anwendungen wurden in einer übergreifenden Diskussion der verschiedenen Experimente die zahlreichen Möglichkeiten, die Verstärkung im SEHRS-Experiment zu beeinflussen, ausführlich dargestellt. Diese reichen von der Optimierung der plasmonischen Eigenschaften der Metallnanostrukturen über die Kontrolle der Wechselwirkung der unter-

suchten Moleküle mit deren Oberfläche durch gezielte Veränderung der chemischen Umgebungsbedingungen bis hin zu physikalischen experimentellen Parametern.

Literatur

- [1] S. J. Cyvin, J. E. Rauch, J. C. Decius, „Theory of Hyper-Raman Effects (Non-linear Inelastic Light Scattering) - Selection Rules and Depolarization Ratios for Second-Order Polarizability“, *Journal of Chemical Physics* **1965**, *43*, 4083–4095.
- [2] V. N. Denisov, B. N. Mavrin, V. B. Podobedov, „Hyper-Raman Scattering by Vibrational Excitations in Crystals, Glasses and Liquids“, *Physics Reports-Review Section of Physics Letters* **1987**, *151*, 1–92.
- [3] J. H. Christie, D. J. Lockwood, „Selection Rules for Three- and Four-Photon Raman Interactions“, *The Journal of Chemical Physics* **1971**, *54*, 1141–1154.
- [4] K. Ikeda, K. Uosaki, „Resonance hyper-Raman scattering of fullerene C-60 microcrystals“, *Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 790–793.
- [5] H. Vogt, G. Neumann, „Observation of infrared active and silent modes in cubic crystals by hyper-Raman scattering“, *physica status solidi (b)* **1979**, *92*, 57–63.
- [6] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, „Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences“, *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1369–1377.
- [7] A. Myers Kelley, „Hyper-Raman Scattering by Molecular Vibrations“, *Annual Review of Physical Chemistry* **2010**, *61*, 41–61.
- [8] V. M. Hallmark, A. Campion, „Selection rules for surface Raman spectroscopy: Experimental results“, *Journal of Chemical Physics* **1986**, *84*, 2933–2941.
- [9] M. Moskovits, J. S. Suh, „Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver“, *The Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 5526–5530.

- [10] J. T. Golab, J. R. Sprague, K. T. Carron, G. C. Schatz, R. P. van Duyne, „A Surface-Enhanced Hyper-Raman Scattering Study of Pyridine Adsorbed onto Silver - Experiment and Theory“, *Journal of Chemical Physics* **1988**, *88*, 7942–7951.
- [11] J. C. Hulteen, M. A. Young, R. P. van Duyne, „Surface-enhanced hyper-Raman scattering (SEHRS) on Ag film over nanosphere (FON) electrodes: Surface symmetry of centrosymmetric adsorbates“, *Langmuir* **2006**, *22*, 10354–10364.
- [12] N. T. Yu, S. M. Nie, L. A. Lipscomb, „Surface-Enhanced Hyper-Raman Spectroscopy with a Picosecond Laser - New Vibrational Information for Noncentrosymmetric Carbocyanine Molecules Adsorbed on Colloidal Silver“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1990**, *21*, 797–802.
- [13] M. Z. Liu, T. W. Lee, S. K. Gray, P. Guyot-Sionnest, M. Pelton, „Excitation of Dark Plasmons in Metal Nanoparticles by a Localized Emitter“, *Physical Review Letters* **2009**, *102*, 107401.
- [14] S. L. Kleinman, B. Sharma, M. G. Blaber, A.-I. Henry, N. Valley, R. G. Freeman, M. J. Natan, G. C. Schatz, R. P. van Duyne, „Structure Enhancement Factor Relationships in Single Gold Nanoantennas by Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy“, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 301–308.
- [15] S. Kadkhodazadeh, J. B. Wagner, V. Joseph, J. Kneipp, H. Kneipp, K. Kneipp, „Electron Energy Loss and One- and Two-Photon Excited SERS Probing of ”Hot” Plasmonic Silver Nanoaggregates“, *Plasmonics* **2013**, *8*, 763–767.
- [16] A. L. Koh, K. Bao, I. Khan, W. E. Smith, G. Kothleitner, P. Nordlander, S. A. Maier, D. W. McComb, „Electron Energy-Loss Spectroscopy (EELS) of Surface Plasmons in Single Silver Nanoparticles and Dimers: Influence of Beam Damage and Mapping of Dark Modes“, *ACS Nano* **2009**, *3*, 3015–3022.
- [17] M. I. Stockman, „Electromagnetic Theory of SERS“ in *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications*, (Hrsg.: K. Kneipp, M. Moskovits, H. Kneipp), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2006**, S. 47–65.
- [18] N. G. Greeneltch, A. S. Davis, N. A. Valley, F. Casadio, G. C. Schatz, R. P. van Duyne, N. C. Shah, „Near-Infrared Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (NIR-SERS) for the Identification of Eosin Y: Theoretical Calculations and

-
- Evaluation of Two Different Nanoplasmonic Substrates“, *Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116*, 11863–11869.
- [19] M. W. Meyer, E. A. Smith, „Optimization of silver nanoparticles for surface enhanced Raman spectroscopy of structurally diverse analytes using visible and near-infrared excitation“, *Analyst* **2011**, *136*, 3542–3549.
- [20] D. B. Chase, B. A. Parkinson, „Surface-Enhanced Raman-Spectroscopy in the Near-Infrared“, *Applied Spectroscopy* **1988**, *42*, 1186–1187.
- [21] R. Prucek, A. Panacek, A. Fargasova, V. Ranc, V. Masek, L. Kvitek, R. Zboril, „Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment-a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy“, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 2242–2248.
- [22] S. W. Bishnoi, C. J. Rozell, C. S. Levin, M. K. Gheith, B. R. Johnson, D. H. Johnson, N. J. Halas, „All-Optical Nanoscale pH Meter“, *Nano Letters* **2006**, *6*, 1687–1692.
- [23] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, K. Kneipp, „Following the Dynamics of pH in Endosomes of Live Cells with SERS Nanosensors“, *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 7421–7426.
- [24] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, K. Kneipp, „One- and Two-Photon Excited Optical pH Probing for Cells Using Surface-Enhanced Raman and Hyper-Raman Nanosensors“, *Nano Letters* **2007**, *7*, 2819–2823.
- [25] A. Michota, J. Bukowska, „Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2003**, *34*, 21–25.
- [26] A. M. Schwartzberg, T. Y. Oshiro, J. Z. Zhang, T. Huser, C. E. Talley, „Improving Nanoprobe Using Surface-Enhanced Raman Scattering from 30-nm Hollow Gold Particles“, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 4732–4736.
- [27] C. E. Talley, L. Jusinski, C. W. Hollars, S. M. Lane, T. Huser, „Intracellular pH Sensors Based on Surface-Enhanced Raman Scattering“, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 7064–7068.
- [28] E. Smith, G. Dent, „Resonance Raman Scattering“ in *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*, John Wiley & Sons, Ltd, **2005**, S. 93–112.
-

- [29] A. Myers Kelley, „Resonance Raman and Resonance Hyper-Raman Intensities: Structure and Dynamics of Molecular Excited States in Solution“, *Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 11975–11991.
- [30] A. Myers Kelley, „A molecular spectroscopic view of surface plasmon enhanced resonance Raman scattering“, *Journal of Chemical Physics* **2008**, *128*, 224702.
- [31] K. Kneipp, D. Fessler, „SERS excitation profile investigation of a cyanine dye adsorbed on silver colloidal particles“, *Chemical Physics Letters* **1984**, *106*, 498–502.
- [32] D. A. Weitz, S. Garoff, J. I. Gersten, A. Nitzan, „The enhancement of Raman-scattering, resonance Raman-scattering, and fluorescence from molecules adsorbed on a rough silver surface“, *Journal of Chemical Physics* **1983**, *78*, 5324–5338.
- [33] G. Britton, „Functions of Intact Carotenoids“ in *Carotenoids - Volume 4: Natural Functions*, (Hrsg.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Basel, **2008**.
- [34] F. Inagaki, M. Tasumi, T. Miyazawa, „Excitation Profile of Resonance Raman Effect of β -Carotene“, *Journal of Molecular Spectroscopy* **1974**, *50*, 286–303.
- [35] S. Sufrà, G. Dellepiane, G. Masetti, G. Zerbi, „Resonance Raman spectrum of β -carotene“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1977**, *6*, 267–272.
- [36] N. Tschirner, M. Schenderlein, K. Brose, E. Schlodder, M. A. Mrogiński, C. Thomsen, P. Hildebrandt, „Resonance Raman spectra of β -carotene in solution and in photosystems revisited: an experimental and theoretical study“, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11*, 11471–11478.
- [37] Y.-J. Tian, J. Zuo, L.-Y. Zhang, Z.-W. Li, S.-Q. Gao, G.-H. Lu, „Study of resonance Raman cross section of aqueous β -carotene at low concentrations“, *Applied Physics B* **2007**, *87*, 727–730.
- [38] S. F. Parker, S. M. Tavender, N. M. Dixon, H. K. Herman, K. P. J. Williams, W. F. Maddams, „Raman spectrum of β -carotene using laser lines from green (514.5 nm) to near-infrared (1064 nm): Implications for the characterization of conjugated polyenes“, *Applied Spectroscopy* **1999**, *53*, 86–91.

-
- [39] M. B. Mamian-Lopez, R. J. Poppi, „SERS hyperspectral imaging assisted by MCR-ALS for studying polymeric microfilms loaded with paracetamol“, *Microchemical Journal* **2015**, *123*, 243–251.
- [40] A. Matschulat, D. Drescher, J. Kneipp, „Surface-Enhanced Raman Scattering Hybrid Nanoprobe Multiplexing and Imaging in Biological Systems“, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3259–3269.
- [41] S. McAughtrie, K. Lau, K. Faulds, D. Graham, „3D optical imaging of multiple SERS nanotags in cells“, *Chemical Science* **2013**, *4*, 3566–3572.
- [42] R. L. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **2000**.
- [43] R. J. H. Clark, T. J. Dines, „Resonance Raman Spectroscopy, and Its Application to Inorganic Chemistry. New Analytical Methods (27)“, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, *25*, 131–158.
- [44] L. D. Ziegler, J. L. Roebber, „Resonance hyper-Raman scattering spectra of ammonia“, *Chemical Physics Letters* **1987**, *136*, 377–382.
- [45] A. C. Albrecht, „On the Theory of Raman Intensities“, *The Journal of Chemical Physics* **1961**, *34*, 1476–1484.
- [46] J. Kneipp, H. Kneipp, K. Kneipp, „SERS - a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics“, *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 1052–1060.
- [47] C. L. Haynes, A. D. McFarland, R. P. van Duyne, „Surface-enhanced Raman spectroscopy“, *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 338A–346A.
- [48] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, M. S. Feld, „Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)“, *Physical Review Letters* **1997**, *78*, 1667–1670.
- [49] S. M. Nie, S. R. Emery, „Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering“, *Science* **1997**, *275*, 1102–1106.
- [50] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, „Surface-enhanced non-linear Raman scattering at the single-molecule level“, *Chemical Physics* **1999**, *247*, 155–162.
-

- [51] N. G. Greeneltch, M. G. Blaber, G. C. Schatz, R. P. van Duyne, „Plasmon-Sampled Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy on Silver Immobilized Nanorod Assemblies and Optimization for Near Infrared (λ_{ex} =1064 nm) Studies“, *Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 2554–2558.
- [52] M. Thomas, S. Mühlig, T. Deckert-Gaudig, C. Rockstuhl, V. Deckert, P. Marquetand, „Distinguishing chemical and electromagnetic enhancement in surface-enhanced Raman spectra: The case of *para*-nitrothiophenol“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, *44*, 1497–1505.
- [53] M. Rycenga, C. M. Cobley, J. Zeng, W. Li, C. H. Moran, Q. Zhang, D. Qin, Y. Xia, „Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications“, *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 3669–3712.
- [54] A. M. Michaels, J. Jiang, L. Brus, „Ag Nanocrystal Junctions as the Site for Surface-Enhanced Raman Scattering of Single Rhodamine 6G Molecules“, *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 11965–11971.
- [55] N. Mattiucci, G. D’Aguanno, H. O. Everitt, J. V. Foreman, J. M. Callahan, M. C. Buncick, M. J. Bloemer, „Ultraviolet surface-enhanced Raman scattering at the plasmonic band edge of a metallic grating“, *Optics Express* **2012**, *20*, 1868–1877.
- [56] T. Dörfer, M. Schmitt, J. Popp, „Deep-UV surface-enhanced Raman scattering“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2007**, *38*, 1379–1382.
- [57] M. Moskovits, „Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, *36*, 485–496.
- [58] T. Vo-Dinh, „Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures“, *Trends in Analytical Chemistry* **1998**, *17*, 557–582.
- [59] A. Campion, P. Kambhampati, „Surface-enhanced Raman scattering“, *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 241–250.
- [60] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, W. Akemann, „Surface-enhanced Raman scattering“, *Journal of Physics: Condensed Matter* **1992**, *4*, 1143–1212.
- [61] M. G. Albrecht, J. A. Creighton, „Anomalous Intense Raman-Spectra of Pyridine at a Silver Electrode“, *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 5215–5217.

-
- [62] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, „Raman-Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode“, *Chemical Physics Letters* **1974**, *26*, 163–166.
- [63] D. L. Jeanmaire, R. P. van Duyne, „Surface Raman Spectroelectrochemistry, Part I. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic Amines Adsorbed on the Anodized Silver Electrode“, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1977**, *84*, 1–20.
- [64] J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht, „Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength“, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* **1979**, *75*, 790–798.
- [65] M. V. Cañamares, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, M. Castillejo, M. Oujja, „Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties“, *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *326*, 103–109.
- [66] V. Joseph, A. Matschulat, J. Polte, S. Rolf, F. Emmerling, J. Kneipp, „SERS enhancement of gold nanospheres of defined size“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42*, 1736–1742.
- [67] S. E. J. Bell, N. M. S. Sirimuthu, „Surface-enhanced Raman spectroscopy as a probe of competitive binding by anions to citrate-reduced silver colloids“, *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 7405–7410.
- [68] G. Chumanov, K. Sokolov, B. W. Gregory, T. M. Cotton, „Colloidal metal films as a substrate for surface-enhanced spectroscopy“, *Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 9466–9471.
- [69] V. Joseph, M. Gensler, S. Seifert, U. Gernert, J. P. Rabe, J. Kneipp, „Nanoscopic Properties and Application of Mix-and-Match Plasmonic Surfaces for Microscopic SERS“, *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 6859–6865.
- [70] K. C. Grabar, R. G. Freeman, M. B. Hommer, M. J. Natan, „Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers“, *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 735–743.
- [71] R. A. Alvarez-Puebla, D. S. Dos Santos, R. F. Aroca, „Surface-enhanced Raman scattering for ultrasensitive chemical analysis of 1 and 2-naphthalenethiols“, *Analyst* **2004**, *129*, 1251–1256.
-

- [72] D. A. Weitz, S. Garoff, T. J. Gramila, „Excitation spectra of surface-enhanced Raman scattering on silver-island films“, *Optics Letters* **1982**, 7, 168–170.
- [73] C. D’Andrea, J. Bochterle, A. Toma, C. Huck, F. Neubrech, E. Messina, B. Fazio, O. M. Marago, E. Di Fabrizio, M. Lamy de la Chapelle, P. G. Gucciardi, A. Pucci, „Optical Nanoantennas for Multiband Surface-Enhanced Infrared and Raman Spectroscopy“, *ACS Nano* **2013**, 7, 3522–3531.
- [74] Y. Chen, G. G. Kang, A. Shah, V. Pale, Y. Tian, Z. P. Sun, I. Tittonen, S. Honkanen, H. Lipsanen, „Improved SERS Intensity from Silver-Coated Black Silicon by Tuning Surface Plasmons“, *Advanced Materials Interfaces* **2014**, 1, 1300008.
- [75] H. Kneipp, K. Kneipp, „Surface-enhanced hyper Raman scattering in silver colloidal solutions“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, 36, 551–554.
- [76] W. N. Leng, A. Myers Kelley, „Surface-enhanced hyper-Raman spectra and enhancement factors for three SERS chromophores. SEHRS spectra on Ag films at pulse energies below 2 pJ“, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 3492–3493.
- [77] T. Itoh, H. Yoshikawa, K. Yoshida, V. Biju, M. Ishikawa, „Evaluation of electromagnetic enhancement of surface enhanced hyper Raman scattering using plasmonic properties of binary active sites in single Ag nanoaggregates“, *Journal of Chemical Physics* **2009**, 130, 214706.
- [78] J. Demuth, K. Christmann, P. Sanda, „The vibrations and structure of pyridine chemisorbed on Ag(111): the occurrence of a compressional phase transformation“, *Chemical Physics Letters* **1980**, 76, 201–206.
- [79] M. Moskovits, D. P. DiLella, K. J. Maynard, „Surface Raman spectroscopy of a number of cyclic aromatic molecules adsorbed on silver: selection rules and molecular reorientation“, *Langmuir* **1988**, 4, 67–76.
- [80] S. Sánchez-Cortés, J. García-Ramos, „Influence of coverage in the surface-enhanced Raman scattering of cytosine and its methyl derivatives on metal colloids: chloride and pH effects“, *Surface Science* **2001**, 473, 133–142.
- [81] S. W. Joo, S. W. Han, H. S. Han, K. Kim, „Adsorption and stability of phthalic acid on a colloidal silver surface: surface-enhanced Raman scattering study“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2000**, 31, 145–150.

-
- [82] J. Chowdhury, M. Ghosh, T. N. Misra, „pH-Dependent surface-enhanced Raman scattering of 8-hydroxy quinoline adsorbed on silver hydrosol“, *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *228*, 372–378.
- [83] B. D. Howes, L. Guerrini, S. Sanchez-Cortes, M. P. Marzocchi, J. V. Garcia-Ramos, G. Smulevich, „The influence of pH and anions on the adsorption mechanism of rifampicin on silver colloids“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2007**, *38*, 859–864.
- [84] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, „Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes“, *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1025–1102.
- [85] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig, „Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra“, *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 4215–4221.
- [86] C. Blatchford, J. Campbell, J. Creighton, „Plasma resonance - enhanced Raman scattering by absorbates on gold colloids: The effects of aggregation“, *Surface Science* **1982**, *120*, 435 –455.
- [87] K. Kneipp, H. Kneipp, J. Kneipp, „Probing plasmonic nanostructures by photons and electrons“, *Chemical Science* **2015**, *6*, 2721–2726.
- [88] H. Kneipp, K. Kneipp, F. Seifert, „Surface-Enhanced Hyper-Raman Scattering (SEHRS) and Surface-Enhanced Raman-Scattering (SERS) by Means of Mode-Locked Ti:Sapphire Laser Excitation“, *Chemical Physics Letters* **1993**, *212*, 374–378.
- [89] L. J. Sherry, S.-H. Chang, G. C. Schatz, R. P. van Duyne, B. J. Wiley, Y. Xia, „Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Nanocubes“, *Nano Letters* **2005**, *5*, 2034–2038.
- [90] S. L. Flegler, J. W. Heckman, K. L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie: Grundlagen - Methoden - Anwendungen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **1995**.
- [91] R. Pecora, „Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids“, *Journal of Nanoparticle Research* **2000**, *2*, 123–131.
- [92] T. Provder, „Challenges in particle size distribution measurement past, present and for the 21st century“, *Progress in Organic Coatings* **1997**, *32*, 143–153.
-

- [93] R. A. Alvarez-Puebla, E. Arceo, P. J. G. Goulet, J. J. Garrido, R. F. Aroca, „Role of Nanoparticle Surface Charge in Surface-Enhanced Raman Scattering“, *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 3787–3792.
- [94] T. L. Doane, C. H. Chuang, R. J. Hill, C. Burda, „Nanoparticle zeta-Potentials“, *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 317–326.
- [95] P. Vandenabeele, H. G. M. Edwards, J. Jehlicka, „The role of mobile instrumentation in novel applications of Raman spectroscopy: archaeometry, geosciences, and forensics“, *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 2628–2649.
- [96] K. Kong, C. Kendall, N. Stone, I. Nottingher, „Raman spectroscopy for medical diagnostics - From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection“, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2015**, *89*, 121 –134.
- [97] Y. Cao, R. C. Qian, D. W. Li, Y. T. Long, „Raman/fluorescence dual-sensing and imaging of intracellular pH distribution“, *Chemical Communications* **2015**, *51*, 17584–17587.
- [98] K. I. Mullen, D. X. Wang, L. G. Crane, K. T. Carron, „Determination of pH with Surface-Enhanced Raman Fiber Optic Probes“, *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 930–936.
- [99] R. A. Jensen, J. Sherin, S. R. Emory, „Single nanoparticle based optical pH probe“, *Applied Spectroscopy* **2007**, *61*, 832–838.
- [100] Z. Y. Wang, A. Bonoiu, M. Samoc, Y. P. Cui, P. N. Prasad, „Biological pH sensing based on surface enhanced Raman scattering through a 2-aminothiophenol-silver probe“, *Biosensors & Bioelectronics* **2008**, *23*, 886–891.
- [101] S. M. Ansar, G. S. Perera, P. Gomez, G. Salomon, E. S. Vasquez, I. W. Chu, S. L. Zou, C. U. Pittman, K. B. Walters, D. M. Zhang, „Mechanistic Study of Continuous Reactive Aromatic Organothiol Adsorption onto Silver Nanoparticles“, *Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 27146–27154.
- [102] R. J. Irving, L. Nelander, I. Wadsö, „Thermodynamics of Ionization of Some Thiols in Aqueous Solution“, *Acta Chemica Scandinavica* **1964**, *18*, 769–787.
- [103] C. X. Ma, J. M. Harris, „Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Investigation of the Potential-Dependent Acid-Base Chemistry of Silver-Immobilized 2-Mercaptobenzoic Acid“, *Langmuir* **2011**, *27*, 3527–3533.

-
- [104] J. P. Scaffidi, M. K. Gregas, V. Seewaldt, T. Vo-Dinh, „SERS-based plasmonic nanobiosensing in single living cells“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *393*, 1135–1141.
- [105] IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, „Nomenclature of Carotenoids“, *Pure and Applied Chemistry* **1975**, *41*, 405–431.
- [106] A. Telfer, „Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre“, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2005**, *4*, 950–956.
- [107] G. Britton, „Functions of Carotenoid Metabolites and Breakdown Products“ in *Carotenoids - Volume 4: Natural Functions*, (Hrsg.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Basel, **2008**.
- [108] C. L. Rock, „Carotenoids: Biology and treatment“, *Pharmacology & Therapeutics* **1997**, *75*, 185–197.
- [109] G. Britton, „Structure and properties of carotenoids in relation to function“, *Faseb Journal* **1995**, *9*, 1551–1558.
- [110] T. Polivka, V. Sundstrom, „Ultrafast dynamics of carotenoid excited states – From solution to natural and artificial systems“, *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 2021–2071.
- [111] S. Saito, M. Tasumi, „Normal-Coordinate Analysis of β -Carotene Isomers and Assignments of the Raman and Infrared Bands“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1983**, *14*, 310–321.
- [112] S. Schlücker, A. Szeghalmi, M. Schmitt, J. Popp, W. Kiefer, „Density functional and vibrational spectroscopic analysis of β -carotene“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2003**, *34*, 413–419.
- [113] J. C. Merlin, „Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid-containing systems“, *Pure and Applied Chemistry* **1985**, *57*, 785–792.
- [114] L. Rimai, M. E. Heyde, D. Gill, „Vibrational Spectra of Some Carotenoids and Related Linear Polyenes. A Raman Spectroscopic Study“, *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 4493–4501.
-

- [115] F. Schulte, J. Mäder, L. W. Kroh, U. Panne, J. Kneipp, „Characterization of Pollen Carotenoids with in situ and High-Performance Thin-Layer Chromatography Supported Resonant Raman Spectroscopy“, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 8426–8433.
- [116] D. Gill, R. G. Kilponen, L. Rimai, „Resonance Raman Scattering of Laser Radiation by Vibrational Modes of Carotenoid Pigment Molecules in Intact Plant Tissues“, *Nature* **1970**, *227*, 743–744.
- [117] H. Schulz, M. Baranska, R. Baranski, „Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis“, *Biopolymers* **2005**, *77*, 212–221.
- [118] R. Mendelsohn, R. W. Vanholten, „Zeaxanthin ([3R,3'R]- β - β -Carotene-3-3'diol) as a Resonance Raman and Visible Absorption Probe of Membrane-Structure“, *Biophysical Journal* **1979**, *27*, 221–235.
- [119] M. van de Ven, M. Kattenberg, G. Vanginkel, Y. K. Levine, „Study of the orientational ordering of carotenoids in lipid bilayers by resonance-Raman spectroscopy“, *Biophysical Journal* **1984**, *45*, 1203–1209.
- [120] J. H. Hooijschuur, M. F. C. Verkaaik, G. R. Davies, F. Ariese, „Raman spectroscopy for future planetary exploration: photodegradation, self-absorption and quantification of carotenoids in microorganisms and mineral matrices“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2015**, *46*, 856–862.
- [121] A. Pascal, A. Telfer, J. Barber, B. Robert, „Fourier-transform resonance Raman spectra of cation carotenoid in photosystem II reaction centres“, *FEBS Letters* **1999**, *453*, 11–14.
- [122] M. G. Vivas, D. L. Silva, L. de Boni, R. Zalesny, W. Bartkowiak, C. R. Mendonca, „Two-photon absorption spectra of carotenoids compounds“, *Journal of Applied Physics* **2011**, *109*, 103529.
- [123] R. Shimada, H. Kano, H. O. Hamaguchi, „Hyper-Raman microspectroscopy: a new approach to completing vibrational spectral and imaging information under a microscope“, *Optics Letters* **2006**, *31*, 320–322.
- [124] R. Shimada, H. Kano, H. Hamaguchi, „Molecular near-field effect and intensity enhancement of solvent modes in resonance hyper-Raman scattering“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, *37*, 469–471.

-
- [125] C. Castiglioni, M. Del Zoppo, G. Zerbi, „Vibrational Raman spectroscopy of polyconjugated organic oligomers and polymers“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1993**, *24*, 485–494.
- [126] P. Adamkiewicz, A. Sujak, W. I. Gruszecki, „Spectroscopic study on formation of aggregated structures by carotenoids: Role of water“, *Journal of Molecular Structure* **2013**, *1046*, 44–51.
- [127] V. R. Salares, N. M. Young, P. R. Carey, H. J. Bernstein, „Excited state (excitation) interactions in polyene aggregates. Resonance Raman and absorption spectroscopic evidence“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1977**, *6*, 282–288.
- [128] A. Beljebbar, G. D. Sockalingum, J. F. Angiboust, M. Manfait, „Near-infrared FT-SERS microspectroscopy on silver and gold surfaces: Technical development, mass sensitivity, and biological applications“, *Applied Spectroscopy* **1996**, *50*, 148–153.
- [129] M. Casella, A. Lucotti, M. Tommasini, M. Bedoni, E. Forvi, F. Gramatica, G. Zerbi, „Raman and SERS recognition of beta-carotene and haemoglobin fingerprints in human whole blood“, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, *79*, 915–919.
- [130] S. Lin, L. Quaroni, W. S. White, T. Cotton, G. Chumanov, „Localization of carotenoids in plasma low-density lipoproteins studied by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy“, *Biopolymers* **2000**, *57*, 249–256.
- [131] M. Michl, B. Vlčková, P. Mojzeš, „Ag colloid–ethanethiol films: spacer-modified substrates for surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy of chromophoric molecules“, *Vibrational Spectroscopy* **1999**, *19*, 239–242.
- [132] V. V. Tarabara, I. R. Nabiev, A. V. Feofanov, „Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of mercaptoethanol monolayer assemblies on silver citrate hydrosol. Preparation and characterization of modified hydrosol as a SERS-active substrate“, *Langmuir* **1998**, *14*, 1092–1098.
- [133] K. Sokolov, P. Khodorchenko, A. Petukhov, I. Nabiev, G. Chumanov, T. M. Cotton, „Contributions of Short-Range and Classical Electromagnetic Mechanisms to Surface-Enhanced Raman Scattering from Several Types of Biomolecules Adsorbed on Cold-Deposited Island Films“, *Applied Spectroscopy* **1993**, *47*, 515–522.
-

- [134] S. Baieva, J. A. Ihalainen, J. J. Toppari, „Strong coupling between surface plasmon polaritons and β -carotene in nanolayered system“, *Journal of Chemical Physics* **2013**, *138*, 044707.
- [135] D. Gust, T. A. Moore, A. L. Moore, P. A. Liddell, „Synthesis of Carotenoporphyrin Models for Photosynthetic Energy and Electron-Transfer“, *Methods in Enzymology* **1992**, *213*, 87–100.
- [136] G. Leatherman, E. N. Durantini, D. Gust, T. A. Moore, A. L. Moore, S. Stone, Z. Zhou, P. Rez, Y. Z. Liu, S. M. Lindsay, „Carotene as a molecular wire: Conducting atomic force microscopy“, *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 4006–4010.
- [137] D. Liu, G. J. Szulczewski, L. D. Kispert, A. Primak, T. A. Moore, A. L. Moore, D. Gust, „A Thiol-Substituted Carotenoid Self-Assembles on Gold Surfaces“, *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 2933–2936.
- [138] M. A. Bryant, J. E. Pemberton, „Surface Raman-Scattering of Self-Assembled Monolayers Formed from 1-Alkanethiols at Ag“, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 3629–3637.
- [139] T. H. Joo, M. S. Kim, K. Kim, „Surface-enhanced Raman scattering of benzenethiol in silver sol“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1987**, *18*, 57–60.
- [140] A. Kudelski, „Surface-enhanced Raman scattering study of monolayers formed from mixtures of 4-mercaptobenzoic acid and various aromatic mercapto-derivative bases“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, *40*, 2037–2043.
- [141] R. Bro, „Multivariate calibration: What is in chemometrics for the analytical chemist?“, *Analytica Chimica Acta* **2003**, *500*, 185 –194.
- [142] B. Doherty, M. Vagnini, K. Dufourmantelle, A. Sgamellotti, B. Brunetti, C. Miliani, „A vibrational spectroscopic and principal component analysis of triarylmethane dyes by comparative laboratory and portable instrumentation“, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *121*, 292–305.
- [143] M. Hedegaard, C. Matthäus, S. Hassing, C. Krafft, M. Diem, J. Popp, „Spectral unmixing and clustering algorithms for assessment of single cells by Raman microscopic imaging“, *Theoretical Chemistry Accounts* **2011**, *130*, 1249–1260.

-
- [144] S. Seifert, V. Merk, J. Kneipp, „Identification of aqueous pollen extracts using surface enhanced Raman scattering (SERS) and pattern recognition methods“, *Journal of Biophotonics* **2016**, *9*, 181–189.
- [145] R. M. Jarvis, A. Brooker, R. Goodacre, „Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bacterial Discrimination Utilizing a Scanning Electron Microscope with a Raman Spectroscopy Interface“, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 5198–5202.
- [146] K. E. Shafer-Peltier, A. S. Haka, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, R. R. Dasari, M. S. Feld, „Model-based biological Raman spectral imaging“, *Journal of Cellular Biochemistry* **2002**, *87*, 125–137.
- [147] J. Kneipp, H. Kneipp, K. Kneipp, „Two-photon vibrational spectroscopy for biosciences based on surface-enhanced hyper-Raman scattering“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 17149–17153.
- [148] C. B. Milojevich, B. K. Mandrell, H. K. Turley, V. Iberi, M. D. Best, J. P. Camden, „Surface-Enhanced Hyper-Raman Scattering from Single Molecules“, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4*, 3420–3423.
- [149] S. M. Nie, L. A. Lipscomb, S. Feng, N. T. Yu, „Resonant and Nonresonant Surface-enhanced Hyper-Raman Spectroscopy with a Picosecond Laser - Effect of the Excitation Pulse Width“, *Chemical Physics Letters* **1990**, *167*, 35–40.
- [150] S. Schneider, G. Brehm, P. Freunscht, „Comparison of Surface-Enhanced Raman and Hyper-Raman Spectra of the Triphenylmethane Dyes Crystal Violet and Malachite Green“, *Physica Status Solidi B-Basic Research* **1995**, *189*, 37–42.
- [151] K. Esbensen, P. Geladi, „Principal Component Analysis: Concept, Geometrical Interpretation, Mathematical Background, Algorithms, History, Practice“ in *Comprehensive Chemometrics, Volume 2*, (Hrsg.: S. D. Brown, R. Tauler, B. Walczak), Elsevier, Oxford, **2009**, S. 211 –226.
- [152] J. H. Ward Jr., „Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function“, *Journal of the American Statistical Association* **1963**, *58*, 236–244.
- [153] S. P. L. Sørensen, „Enzymstudien II. Über die Messung und Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen“, *Biochemische Zeitschrift* **1909**, *21*, 131–304.
-

- [154] P. C. Lee, D. Meisel, „Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols“, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, *86*, 3391–3395.
- [155] N. Leopold, B. Lendl, „A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride“, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 5723–5727.
- [156] X. Y. Dong, X. H. Ji, J. Jing, M. Y. Li, J. Li, W. S. Yang, „Synthesis of Triangular Silver Nanoprisms by Stepwise Reduction of Sodium Borohydride and Trisodium Citrate“, *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 2070–2074.
- [157] S. Guo, S. Dong, E. Wang, „A General Route to Construct Diverse Multifunctional Fe₃O₄/Metal Hybrid Nanostructures“, *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15*, 2416–2424.
- [158] J. X. Chen, W. S. Liao, X. Chen, T. L. Yang, S. E. Wark, D. H. Son, J. D. Batteas, P. S. Cremer, „Evaporation-Induced Assembly of Quantum Dots into Nanorings“, *ACS Nano* **2009**, *3*, 173–180.
- [159] B. Amos, G. McConnell, T. Wilson, „Confocal Microscopy“ in *Comprehensive biophysics. 2. Biophysical techniques for characterization of cells*, (Hrsg.: P. Schuille, E. H. Egelman), Elsevier, Amsterdam, **2012**, S. 3 –23.
- [160] A. Savitzky, M. J. E. Golay, „Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures.“, *Analytical Chemistry* **1964**, *36*, 1627–1639.
- [161] Z.-M. Zhang, S. Chen, Y.-Z. Liang, Z.-X. Liu, Q.-M. Zhang, L.-X. Ding, F. Ye, H. Zhou, „An intelligent background-correction algorithm for highly fluorescent samples in Raman spectroscopy“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2010**, *41*, 659–669.
- [162] M. Damaghi, J. W. Wojtkowiak, R. J. Gillies, „pH Sensing and Regulation in Cancer“, *Frontiers in Physiology* **2013**, *4*, 370.
- [163] D. E. Johnson, P. Ostrowski, V. Jaumouillé, S. Grinstein, „The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH“, *The Journal of Cell Biology* **2016**, *212*, 677–692.
- [164] I. Mellman, R. Fuchs, A. Helenius, „Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways“, *Annual Review of Biochemistry* **1986**, *55*, 663–700.

-
- [165] Y. Y. Yu, S. Handa, T. Yajima, M. Futamata, „Flocculation of Ag nanoparticles elucidating adsorbed p-mercaptobenzoic acid by surface enhanced Raman scattering“, *Chemical Physics Letters* **2013**, 560, 49–54.
- [166] S. B. Lee, K. Kim, M. S. Kim, „Surface-Enhanced Raman-Scattering of ortho-Mercaptobenzoic Acid in Silver Sol“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1991**, 22, 811–817.
- [167] A. S. L. Lee, Y. S. Li, „Surface-enhanced Raman, normal Raman and infrared spectra of chlorobenzoic acids“, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1996**, 52, 173–184.
- [168] Y. Liu, H. Yuan, A. M. Fales, T. Vo-Dinh, „pH-sensing nanostar probe using surface-enhanced Raman scattering (SERS): theoretical and experimental studies“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, 44, 980–986.
- [169] H. K. Park, S. B. Lee, K. Kim, M. S. Kim, „Surface-Enhanced Raman-Scattering of para-Aminobenzoic Acid at Ag Electrode“, *Journal of Physical Chemistry* **1990**, 94, 7576–7580.
- [170] Y. Wang, W. Ji, H. M. Sui, Y. Kitahama, W. D. Ruan, Y. Ozaki, B. Zhao, „Exploring the Effect of Intermolecular H-Bonding: A Study on Charge-Transfer Contribution to Surface-Enhanced Raman Scattering of *p*-Mercaptobenzoic Acid“, *Journal of Physical Chemistry C* **2014**, 118, 10191–10197.
- [171] S. H. Cho, H. S. Han, D.-J. Jang, K. Kim, M. S. Kim, „Raman Spectroscopic Study of 1,4-Benzenedithiol Adsorbed on Silver“, *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, 99, 10594–10599.
- [172] C. Chachaty, D. Gust, T. A. Moore, G. A. Nemeth, P. A. Liddell, A. L. Moore, „NMR spectra of carotenoporphyrins. Computer-assisted conformational analysis“, *Organic Magnetic Resonance* **1984**, 22, 39–46.
- [173] E. S. Hand, K. A. Belmore, L. D. Kispert, „NMR Chemical Shift Assignments for 7'-Substituted Aromatic-7'-apo- β -Carotenes“, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1993**, 31, 516–517.
- [174] E. S. Hand, K. A. Belmore, L. D. Kispert, „AM1 electron density and NMR spectral studies of carotenoids with a strong terminal electron acceptor“, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2* **1993**, 659–663.
-

- [175] H. Hashimoto, Y. Miki, M. Kuki, T. Shimamura, H. Utsumi, Y. Koyama, „Isolation by high-pressure liquid chromatography of the cis-trans isomers of β -apo-8'-carotenal. Determination of their S_0 -state configurations by NMR spectroscopy and prediction of their S_1 - and T_1 -state configurations by transient Raman spectroscopy“, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 9216–9225.
- [176] W. Vetter, G. Englert, N. Rigassi, U. Schwieter, „Spectroscopic Methods“ in *Carotenoids*, (Hrsg.: O. Isler, H. Gutmann, U. Solms), Birkhäuser Basel, Basel, **1971**, S. 189–266.
- [177] T. A. Albright, W. J. Freeman, E. E. Schweizer, „Nuclear Magnetic Resonance Studies. IV. Carbon and Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance of Phosphine Oxides and Related Compounds“, *Journal of Organic Chemistry* **1975**, *40*, 3437–3441.
- [178] F.-H. Hu, L.-S. Wang, S.-F. Cai, „Solubilities of Triphenylphosphine Oxide in Selected Solvents“, *Journal of Chemical & Engineering Data* **2009**, *54*, 1382–1384.
- [179] N. E. Craft, J. H. Soares, „Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, *40*, 431–434.
- [180] S. E. J. Bell, N. M. S. Sirimuthu, „Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Sub-Micromolar Detection of DNA/RNA Mononucleotides“, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 15580–15581.
- [181] K. A. Huynh, K. L. Chen, „Aggregation Kinetics of Citrate and Polyvinylpyrrolidone Coated Silver Nanoparticles in Monovalent and Divalent Electrolyte Solutions“, *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, 5564–5571.
- [182] P. Hildebrandt, M. Stockburger, „Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of Rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver“, *The Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 5935–5944.
- [183] K. Kneipp, H. Kneipp, J. Kneipp, „Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates - From single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells“, *Accounts of Chemical Research* **2006**, *39*, 443–450.

-
- [184] F. Bensebaa, Y. Zhou, A. G. Brolo, D. E. Irish, Y. Deslandes, E. Kruus, T. H. Ellis, „Raman characterization of metal-alkanethiolates“, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1999**, *55*, 1229–1236.
- [185] M. Kazanci, J. P. Schulte, C. Douglas, P. Fratzl, D. Pink, T. Smith-Palmer, „Tuning the Surface-Enhanced Raman Scattering Effect to Different Molecular Groups by Switching the Silver Colloid Solution pH“, *Applied Spectroscopy* **2009**, *63*, 214–223.
- [186] S. M. Nie, L. A. Lipscomb, N. T. Yu, „Surface-enhanced Hyper-Raman Spectroscopy“, *Applied Spectroscopy Reviews* **1991**, *26*, 203–276.
- [187] V.-M. Taavitsainen, „Denoising and Signal-to-Noise Ratio Enhancement: Derivatives“ in *Comprehensive Chemometrics, Volume 2*, (Hrsg.: S. D. Brown, R. Tauler, B. Walczak), Elsevier, Oxford, **2009**, S. 57 –66.
- [188] R. Shimada, H. O. Hamaguchi, „Solute-solvent intermolecular vibronic coupling as manifested by the molecular near-field effect in resonance hyper-Raman scattering“, *Journal of Chemical Physics* **2011**, *134*, 034516.
- [189] A. Myers Kelley, W. N. Leng, M. Blanchard-Desce, „Resonance hyper-Raman scattering from conjugated organic donor-acceptor ”push-pull”chromophores with large first hyperpolarizabilities“, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 10520–10521.
- [190] T. Lerond, J. Proust, H. Yockell-Lelievre, D. Gerard, J. Plain, „Self-assembly of metallic nanoparticles into plasmonic rings“, *Applied Physics Letters* **2011**, *99*, 3.
- [191] J. R. Anema, A. G. Brolo, A. Felten, C. Bittencourt, „Surface-enhanced Raman scattering from polystyrene on gold clusters“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2010**, *41*, 745–751.
- [192] K. Pushpavanam, S. Santra, K. Rege, „Biotemplating Plasmonic Nanoparticles Using Intact Microfluidic Vasculature of Leaves“, *Langmuir* **2014**, *30*, 14095–14103.
- [193] Y. Abboud, A. Eddahbi, A. El Bouari, H. Aitenneite, K. Brouzi, J. Mouslim, „Microwave-assisted approach for rapid and green phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous onion (*Allium cepa*) extract and their antibacterial activity“, *Journal of Nanostructure in Chemistry* **2013**, *3*, 1–7.
-

- [194] U. Parida, B. Bindhani, P. Nayak, „Green Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles Using Onion (*Allium cepa*) Extract“, *World Journal of Nano Science and Engineering* **2011**, *1*, 93–98.
- [195] L. Guerrini, Z. Jurasekova, C. Domingo, M. Pérez-Méndez, P. Leyton, M. Campos Vallette, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, „Importance of Metal-Adsorbate Interactions for the Surface-enhanced Raman Scattering of Molecules Adsorbed on Plasmonic Nanoparticles“, *Plasmonics* **2007**, *2*, 147–156.
- [196] B. Giese, D. McNaughton, „Surface-enhanced Raman spectroscopic and density functional theory study of adenine adsorption to silver surfaces“, *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 101–112.
- [197] C. Otto, T. J. J. Vandenweel, F. F. M. Demul, J. Greve, „Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA bases“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1986**, *17*, 289–298.
- [198] K. Takamura, A. Mori, F. Watanabe, „Structural effects of nucleic acid bases, nucleosides and nucleotides on their adsorption at a gold electrode studied by specular reflectivity measurement“, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1981**, *8*, 125–136.
- [199] C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P. C. White, „Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering“, *Langmuir* **1995**, *11*, 3712–3720.
- [200] H. B. Lueck, D. C. Daniel, J. L. McHale, „Resonance Raman-Study of Solvent Effects on a Series of Triarylmethane Dyes“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1993**, *24*, 363–370.
- [201] A. V. Baranov, Y. S. Bobovich, „Super-Enhanced Hyper-Raman-Scattering from Dyes Adsorbed on Colloidal Silver Particles“, *JETP Letters* **1982**, *36*, 339–343.
- [202] L. Angeloni, G. Smulevich, M. P. Marzocchi, „Resonance Raman-Spectrum of Crystal Violet“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1979**, *8*, 305–310.
- [203] M. Cañamares, C. Chenal, R. Birke, J. Lombardi, „DFT, SERS, and Single-Molecule SERS of Crystal Violet“, *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 20295–20300.

-
- [204] J. Gicquel, M. Carles, H. Bodot, „Resonance Raman Investigation of Charge-Transfer Complexes between a Trityl Cation (Crystal Violet) and Sulfonated Azo Derivatives“, *Journal of Physical Chemistry* **1979**, *83*, 699–706.
- [205] S. Sunder, H. J. Bernstein, „Resonance Raman-Spectrum of a Deuterated Crystal Violet - $[p(\text{CH}_3)_2\text{N}\cdot\text{C}_6\text{D}_4]_3\text{C}^+\text{Cl}^-$ “, *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1981**, *59*, 964–967.
- [206] R. E. Weston, Tsukamoto, A. N. N. Lichtin, „Infrared spectra and vibrational frequency assignment of triphenylcarbinol, triphenylmethyl chloride, triphenylmethyl fluoroborate, and their 1- ^{13}C and $\phi\text{-d}_5$ analogs“, *Spectrochimica Acta* **1966**, *22*, 433–453.
- [207] D. W. A. Sharp, N. Sheppard, „135. Complex fluorides. Part VIII. The preparation and properties of salts of the triphenylmethyl cation: the infrared spectrum and configuration of the ion“, *Journal of the Chemical Society* **1957**, 674–682.
- [208] E. J. Liang, X. L. Ye, W. Kiefer, „Surface-enhanced Raman spectroscopy of crystal violet in the presence of halide and halate ions with near-infrared wavelength excitation“, *Journal of Physical Chemistry A* **1997**, *101*, 7330–7335.
- [209] I. Persaud, W. E. L. Grossman, „Surface-enhanced Raman-scattering of triphenylmethane dyes on colloidal silver“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1993**, *24*, 107–112.
- [210] A. Kudelski, „Raman studies of rhodamine 6G and crystal violet sub-monolayers on electrochemically roughened silver substrates: Do dye molecules adsorb preferentially on highly SERS-active sites?“, *Chemical Physics Letters* **2005**, *414*, 271–275.
- [211] J. J. Andrew, T. M. Hancewicz, „Rapid analysis of Raman image data using two-way multivariate curve resolution“, *Applied Spectroscopy* **1998**, *52*, 797–807.
- [212] J. Morla-Folch, H.-n. Xie, P. Gisbert-Quilis, S. G.-d. Pedro, N. Pazos-Perez, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, „Ultrasensitive Direct Quantification of Nucleobase Modifications in DNA by Surface-Enhanced Raman Scattering: The Case of Cytosine“, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 13650–13654.
- [213] L. D. Ziegler, „Hyper-Raman Spectroscopy“, *Journal of Raman Spectroscopy* **1990**, *21*, 769–779.
-

- [214] P. B. Johnson, R. W. Christy, „Optical Constants of Noble Metals“, *Physical Review B* **1972**, *6*, 4370–4379.
- [215] S. E. J. Bell, J. N. Mackle, N. M. S. Sirimuthu, „Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy of dipicolinic acid-towards rapid anthrax endospore detection“, *Analyst* **2005**, *130*, 545–549.
- [216] S. Handa, Y. Y. Yu, M. Futamata, „Adsorbed state of p-mercaptobenzoic acid on silver nanoparticles“, *Vibrational Spectroscopy* **2014**, *72*, 128–133.
- [217] A. D. McFarland, M. A. Young, J. A. Dieringer, R. P. van Duyne, „Wavelength-scanned surface-enhanced Raman excitation spectroscopy“, *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 11279–11285.
- [218] R. A. Alvarez-Puebla, „Effects of the Excitation Wavelength on the SERS Spectrum“, *Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, *3*, 857–866.
- [219] T. van Dijk, S. T. Sivapalan, B. M. DeVetter, T. K. Yang, M. V. Schulmerich, C. J. Murphy, R. Bhargava, P. S. Carney, „Competition Between Extinction and Enhancement in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy“, *Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4*, 1193–1196.
- [220] M. Osawa, N. Matsuda, K. Yoshii, I. Uchida, „Charge transfer resonance Raman process in surface-enhanced Raman scattering from *p*-aminothiophenol adsorbed on silver: Herzberg-Teller contribution“, *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 12702–12707.
- [221] Y.-F. Huang, H.-P. Zhu, G.-K. Liu, D.-Y. Wu, B. Ren, Z.-Q. Tian, „When the Signal Is Not from the Original Molecule To Be Detected: Chemical Transformation of para-Aminothiophenol on Ag during the SERS Measurement“, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 9244–9246.
- [222] Y. Wang, H. Chen, S. Dong, E. Wang, „Surface enhanced Raman scattering of p-aminothiophenol self-assembled monolayers in sandwich structure fabricated on glass“, *The Journal of Chemical Physics* **2006**, *124*, 074749.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich allen Menschen danken, die mich während der Experimente begleitet und entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich meiner Betreuerin Prof. Dr. Janina Kneipp, dafür, dass sie es mir ermöglicht hat, dieses interessante Thema zu bearbeiten, für ihre stetige Unterstützung und Motivation und für alles, das ich in den vergangenen Jahren von ihr lernen durfte.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Zsuzsanna Heiner für unzählige Ratschläge und gemeinsame Tage und Abende im Labor, für die Betrachtung der Ergebnisse vom physikalischen Standpunkt und für ihren großen Optimismus.

Dr. Harald Kneipp danke ich für viele lehrreiche Gespräche über Optik und Spektroskopie sowie für experimentelle Unterstützung mit den Raman-Messaufbauten.

Bei Prof. Dr. Rainer Mahrwald möchte ich mich für hilfreiche Ratschläge bezüglich der Synthese des funktionalisierten Carotins bedanken. Angela Thiesies und Katharina Pfaff danke ich für die Messung der NMR-Spektren des funktionalisierten Carotins und der Vorprodukte.

Sören Selve und Dr. Ulrich Gernert von der Zentraleinrichtung Elektronenmikroskopie der Technischen Universität Berlin, sowie Dr. Guillermo Orts-Gil von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) gebührt Dank für die Elektronenmikroskopieaufnahmen der Silbrenanopartikel.

Marta Espina Palanco und Prof. Dr. Katrin Kneipp von Danmarks Tekniske Universitet (DTU) Kopenhagen danke ich für das Zurverfügungstellen der Zwiebelproben und Klaus Bo Mogensen möchte ich für die Erstellung von Dunkelfeldmikroskopieaufnahmen dieser Proben danken.

Dr. Ralf Bienert danke ich für die Unterstützung bei zeta-Potential- und DLS-Messungen an der BAM. Dr. Knut Rurack und Robert Höhne danke ich für Ermöglichung und Unterstützung der Experimente mit dem Kontaktpotter an der BAM.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kneipp an der Humboldt-Universität zu Berlin möchte ich ganz herzlich für die angenehme Atmosphäre und die anregenden Diskussionen in den vergangenen Jahren danken. Insbesondere sei Fani Madzharova gedankt für den Algorithmus zur automatisierten Entfernung von Spikes aus Hyper-Raman-Spektren und Unterstützung bei der Basislinienkorrektur der Spektren. Tina Büchner, Sebastian Fredrich und Dr. Virginia Merk möchte ich für die Zurverfügungstellung der durch Reduktion mit Natriumborhydrid erzeugten Silbernanopartikel danken. Dr. Virginia Merk danke ich außerdem für Starthilfe bei der Immobilisierung der Nanopartikel und für einige von ihr lithographisch hergestellte Substrate. Alexander Nerz danke ich für umfangreiche Experimente zur Immobilisierung von Silbernanopartikeln in Gegenwart von Polystyrentemplaten im Rahmen seines Forschungspraktikums. Dr. Stephan Seifert möchte ich für seine Unterstützung zur Messung der bei 514 nm angeregten SERS-Spektren danken. Ingrid Zeise und Annette Rothe möchte ich für viele motivierende und hilfreiche Gespräche und für die gute Bürogemeinschaft danken. Vesna Živanović danke ich für Diskussionen, die mir die Anwendungsmöglichkeiten meiner Arbeit verdeutlicht und mich motiviert haben.

Schließlich möchte ich auch die finanzielle Unterstützung durch den Europäischen Forschungsrat im Rahmen des ERC Starting Grant Nr. 259432 (MULTIBIOPHOT) dankend anerkennen.

Verwendete Symbole und Abkürzungen

| | |
|--------------|---|
| A | Extinktion |
| APTES | 3-Aminopropyltriethoxysilan |
| c | Konzentration |
| cps | Counts pro Sekunde |
| CV | Kristallviolett (engl. <i>crystal violet</i>) |
| d | Schichtdicke |
| DLS | Dynamische Lichtstreuung |
| E | Elektrische Feldstärke |
| E_{SERS} | SERS-Feldstärke |
| EF | Verstärkungsfaktor (engl. <i>enhancement factor</i>) |
| EF_{SEHRS} | Verstärkungsfaktor im SEHRS-Experiment |
| EF_{SERS} | Verstärkungsfaktor im SERS-Experiment |
| G_{SEHRS} | Elektromagnetische Verstärkung im SEHRS-Experiment |
| G_{SERS} | Elektromagnetische Verstärkung im SERS-Experiment |
| $g(\nu_0)$ | Verstärkungsfaktor der Amplitude des Anregungslichts |
| $g(\nu_S)$ | Verstärkungsfaktor der Amplitude des Streulichts |

Verwendete Symbole und Abkürzungen

| | |
|-------------|--|
| h | Plancksches Wirkungsquantum |
| HCA | Hierarchische Clusteranalyse |
| I | Intensität |
| I_0 | Anregungsintensität |
| I_{HRS} | Intensität der Hyper-Raman-Streuung |
| I_{RS} | Intensität der Raman-Streuung |
| I_{SEHRS} | SEHRS-Intensität |
| I_{SERS} | SERS-Intensität |
| J | Kopplungskonstante |
| MG | Malachitgrün |
| N | Molekülanzahl |
| N_{RS} | Anzahl der zum Raman-Signal beitragenden Moleküle |
| N_{SERS} | Anzahl der zum SERS-Signal beitragenden Moleküle |
| n | Brechungsindex |
| NA | Numerische Apertur |
| n.b. | nicht bestimmt |
| NIR | Nahes Infrarot |
| NMR | Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>) |
| NP | Nanopartikel |
| P | Loadings-Matrix |
| PC | Hauptkomponente (engl. <i>principal component</i>) |
| PCA | Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principal component analysis</i>) |

| | |
|-----------------------------------|---|
| <i>p</i>ATP | <i>para</i> -Aminothiophenol |
| <i>p</i>MBA | <i>para</i> -Mercaptobenzoessäure |
| <i>q</i> | Volumenanteil von Silber in einer kolloidalen Lösung |
| R | Residuenmatrix |
| <i>r_{axial}</i> | Axiale Auflösung |
| <i>r_{lateral}</i> | Laterale Auflösung |
| RT | Raumtemperatur |
| SEHRS | Oberflächenverstärkte Hyper-Raman-Streuung (engl. <i>surface-enhanced hyper-Raman scattering</i>) |
| SEM | Rasterelektronenmikroskopie (engl. <i>scanning electron microscopy</i>) |
| SERRS | Oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Streuung (engl. <i>surface-enhanced resonance Raman scattering</i>) |
| SERS | Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (engl. <i>surface-enhanced Raman scattering</i>) |
| T | Scores-Matrix |
| THF | Tetrahydrofuran |
| UV | Ultraviolett |
| Vis | Sichtbares Licht (engl. <i>visible</i>) |
| X | Datenmatrix |
| α | Polarisierbarkeit |
| β | Hyperpolarisierbarkeit |
| δ | Chemische Verschiebung |
| ϵ | Relative Permittivität von Silber |
| ϵ' | Realteil der relativen Permittivität von Silber |

Verwendete Symbole und Abkürzungen

| | |
|---------------------|---|
| ϵ'' | Imaginärteil der relativen Permittivität von Silber |
| ϵ | Extinktionskoeffizient |
| λ_0 | Anregungswellenlänge |
| μ | Dipolmoment |
| ν | Frequenz |
| ν_0 | Frequenz der Anregungsstrahlung |
| ν_M | Frequenz der Molekülschwingung |
| ν_{HRS} | Frequenz der Hyper-Raman-Streuung |
| ν_{RHRS} | Frequenz der Resonanz-Hyper-Raman-Streuung |
| ν_{RRS} | Frequenz der Resonanz-Raman-Streuung |
| ν_{RS} | Frequenz der Raman-Streuung |
| $\bar{\nu}$ | Wellenzahl |
| $\bar{\nu}_0$ | Wellenzahl der Anregungsstrahlung |
| $\bar{\nu}_M$ | Wellenzahl der Molekülschwingung (Raman-Verschiebung) |
| $\bar{\nu}_{SEHRS}$ | Absolute Wellenzahl der SEHRS-Bande |
| $\bar{\nu}_{SERS}$ | Absolute Wellenzahl der SERS-Bande |
| σ | Streuquerschnitt |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 1.1 | (a) Schematische Darstellung von nicht-resonanter und resonanter Hyper-Raman-Streuung anhand der Energieniveaus im untersuchten Molekül. (b) Konzept der in dieser Arbeit miteinander verglichenen SE(R)HRS- und SE(R)RS-Experimente. | 13 |
| 2.1 | Schematische Darstellung von (a) nicht-resonanter und (b) resonanter Stokes-Raman- und Stokes-Hyper-Raman-Streuung anhand der Energieniveaus im untersuchten Molekül. | 19 |
| 2.2 | Struktur von <i>para</i> -Mercaptobenzoessäure (a) in der protonierten Form bei niedrigem pH-Wert und (b) in der deprotonierten Form bei hohem pH-Wert. | 27 |
| 2.3 | Syntheseweg zur Herstellung von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin (5) aus 8'-Apo- β -carotinal (1) nach [135, 136] und die Struktur des nicht funktionalisierten β -Carotins (6) zum Vergleich. | 31 |
| 4.1 | Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen der in dieser Arbeit verwendeten Sorten von Silbernanopartikeln. Hergestellt durch (a) Reduktion und Stabilisierung mit Citrat, (b) Reduktion mit Hydroxylamin, (c) Reduktion mit Natriumborhydrid und Stabilisierung mit Citrat I, (d) Reduktion mit Natriumborhydrid und Stabilisierung mit Citrat II. . | 52 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.2 | Extinktionsspektren der Silbernanoaggregate mit <i>p</i> MBA so wie sie im SEHRS-Experiment eingesetzt wurden. (a) Spektren der verschiedenen Partikelsorten bei pH 7, (b) Extinktion bei 1064 nm der Silbernanoaggregate bei verschiedenen pH-Werten, (c-e) Spektren für jeweils eine Partikelsorte bei verschiedenen pH-Werten: (c) Reduktion mit Citrat, (d) Reduktion mit Hydroxylamin, (e) Reduktion mit NaBH ₄ (Methode II). | 53 |
| 4.3 | SEHRS-Spektren von <i>p</i> MBA ($9 \cdot 10^{-7}$ mol L ⁻¹) bei den pH-Werten 2, 7 und 12 mit Silbernanopartikeln, die hergestellt wurden durch Reduktion mit (a) Citrat, (b) Hydroxylamin, (c) NaBH ₄ , Methode I, (d) NaBH ₄ , Methode II. Anregungswellenlänge: 1064 nm. | 54 |
| 4.4 | SERS-Spektren von <i>p</i> MBA ($9 \cdot 10^{-7}$ mol L ⁻¹) bei den pH-Werten 2, 7 und 12 mit Silbernanopartikeln, die hergestellt wurden durch Reduktion mit (a) Citrat, (b) Hydroxylamin, (c) NaBH ₄ , Methode I, (d) NaBH ₄ , Methode II. Anregungswellenlänge: 532 nm. | 55 |
| 4.5 | Intensitätsverhältnisse der Banden bei (a-b) 1365 cm ⁻¹ und 1178 cm ⁻¹ bzw. bei (c-d) 1685 cm ⁻¹ und 1178 cm ⁻¹ in den SEHRS-Spektren bei Anregung mit 1064 nm und SERS-Spektren bei Anregung mit 532 nm von <i>p</i> MBA mit den Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat (a, c) bzw. Hydroxylamin (b, d) hergestellt wurden, im pH-Wert-Bereich 2-8. | 57 |
| 4.6 | Intensitätsverhältnisse der Banden bei 1365 cm ⁻¹ und 1178 cm ⁻¹ in den (a) SEHRS-Spektren (1064 nm) und (b) SERS-Spektren (532 nm) für mehrere Nanopartikelsorten im pH-Wert-Bereich 2-12. | 58 |
| 4.7 | SERS-Spektren von <i>p</i> MBA ($9 \cdot 10^{-7}$ mol L ⁻¹) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit (a) Citrat bzw. (b) Hydroxylamin erhalten wurden, bei verschiedenen pH-Werten. Anregungswellenlänge: 1064 nm. | 60 |
| 4.8 | Intensitätsverhältnisse der Banden bei 363 cm ⁻¹ und 523 cm ⁻¹ in den SERS-Spektren (1064 nm) von <i>p</i> MBA bei den pH-Werten 2-8. | 61 |
| 4.9 | Ausschnitte der (a) SEHRS-Spektren und (b,c) SERS-Spektren von <i>p</i> MBA mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden. Anregungswellenlängen: (a, b) 1064 nm, (c) 532 nm. | 63 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.10 | Ausschnitte der (a) SEHRS-Spektren und (b) SERS-Spektren von <i>p</i> MBA mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden. Anregungswellenlängen: (a) 1064 nm, (b) 532 nm. | 65 |
| 5.1 | Extinktionsspektren von (a) 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin, $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in Dichlormethan und (b) β -Carotin, $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ in Ethanol. | 68 |
| 5.2 | Extinktionsspektren der mit MgSO_4 aggregierten Silbernanopartikel mit 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin bzw. der Silbernanoaggregate mit nicht funktionalisiertem β -Carotin und ohne Carotine. . . . | 70 |
| 5.3 | SERRS-Spektren von (a-c) 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und (d-f) β -Carotin in Gegenwart unterschiedlicher Salze: (a, d) ohne Salz, (b, e) $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NaCl, (c, f) $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ MgSO_4 . Anregungswellenlänge: 532 nm. | 71 |
| 5.4 | SERS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und β -Carotin. Anregungswellenlänge: 1064 nm. | 73 |
| 5.5 | Vergleich der SERRS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und β -Carotin mit dem Spektrum der Silbernanoaggregate ohne Carotinmoleküle. | 75 |
| 5.6 | (a) SEHRS-Spektren und (b) SERRS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und β -Carotin. | 77 |
| 5.7 | (a) Nicht-resonant angeregte Raman-Spektren, (b) Hyper-Raman-Spektren und (c) resonant angeregte Raman-Spektren von Feststoffproben von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und β -Carotin. . . . | 79 |
| 5.8 | Zweite Ableitung des SEHRS-Spektrums von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin in Abb. 5.6 a. | 81 |
| 5.9 | Hyper-Raman-Spektren von (a) 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) und (b) β -Carotin ($3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) in wässriger Lösung. Anregungswellenlänge: 1064 nm. | 82 |
| 5.10 | (a) SERS-Spektrum, angeregt bei 1064 nm, von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin. 100 Spektren von 5 verschiedenen Proben wurden basislinienkorrigiert und gemittelt. (b) SEHRS-Spektrum von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin wie in Abb. 5.6 a und (c) SERRS-Spektrum von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin wie in Abb. 5.6 b. | 85 |

| | | |
|-----|--|----|
| 6.1 | Extinktionsspektren von (a) Silbernanopartikeln in kolloidaler Lösung, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurden, ohne und mit Zusatz von 10 % (v/v) Toluol und (b) immobilisierten Silbernanopartikeln vor und nach der Behandlung mit Toluol, sowie in Gegenwart von Polystyren (PS) immobilisierte Silbernanopartikel nach dem Auflösen des Polystyrens in Toluol. | 90 |
| 6.2 | (a) SERS-Spektrum von Kristallviolett auf immobilisierten Silbernanopartikeln, (b) lokale Verteilung der Verstärkungsfaktoren (EF), bestimmt anhand der Bande von Kristallviolett bei 1174 cm^{-1} auf den immobilisierten Silbernanopartikeln, (c) SERS-Spektrum von Kristallviolett auf in Gegenwart von Polystyren-Mikropartikeln immobilisierten Silbernanopartikeln nach der Behandlung mit Toluol, (d) lokale Verteilung der Verstärkungsfaktoren auf derselben Probe wie in (c). | 91 |
| 6.3 | (a) Dunkelfeldmikroskopiebild einer Zwiebelgewebeprobe mit <i>in situ</i> hergestellten Silbernanopartikeln, Skala: $100\text{ }\mu\text{m}$; Bild aufgenommen von Klaus Mogensen an der DTU Kopenhagen mit einem Eclipse LN200N Mikroskop (Nikon) bei 10facher Vergrößerung mit einer 50 W Halogenlampe, Manuskript zur Publikation eingereicht: M. Espina Palanco <i>et al.</i> 2016. (b) SEHRS-Spektrum und (c) SERS-Spektrum von Kristallviolett ($10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$) auf einer Zwiebelgewebeprobe mit <i>in situ</i> hergestellten Silbernanopartikeln. | 94 |
| 6.4 | Chemische Karten von Ausschnitten der Zwiebelgewebeproben mit <i>in situ</i> hergestellten Silbernanostrukturen, basierend auf der Intensität der C-H-Deformationsschwingungsbande von Kristallviolett in (a) SEHRS-Spektren bei 1175 cm^{-1} und (b) SERS-Spektren bei 1179 cm^{-1} | 95 |
| 6.5 | Schematische Darstellung der Immobilisierung von Silbernanopartikeln auf Glasoberflächen in Gegenwart von Adenin bzw. Cytosin zur Bildung von mikrostrukturierten Oberflächen. | 97 |
| 6.6 | (a-c) Exemplarische SERS-Spektren von Lösungen von (a) Adenin, (b) einer 1:1-Mischung von Adenin und Cytosin und (c) Cytosin auf immobilisierten Silbernanopartikeln. (d-f) Statistische Auswertung des Intensitätsverhältnisses der Ringatemschwingungsbanden bei 735 cm^{-1} und 798 cm^{-1} für die Spektren von (d) Adenin, (e) der Mischung und (f) Cytosin. Anregungswellenlänge: 785 nm | 99 |

| | | |
|------|---|-----|
| 6.7 | (a) Exemplarische SERS-Spektren aus den drei verschiedenen Regionen einer Oberfläche, die nach Abb. 6.5 a hergestellt wurde. (b-d) Verteilung des Intensitätsverhältnisses der Ringatemschwingungsbanden von Adenin (I_{735}) und Cytosin (I_{798}) in den SERS-Spektren innerhalb von Ausschnitten (b) der Adeninregion, (c) der Mischregion und (d) der Cytosinregion. Anregungswellenlänge: 785 nm. | 101 |
| 6.8 | (a) Lichtmikroskopiebild eines Ausschnitts der Grenzregion zwischen Cytosinregion (links) und Mischregion (rechts) einer nach Abb. 6.5 hergestellten Probe. (b) Intensitätsverhältnis der Ringatemschwingungsbanden von Adenin und Cytosin in den SERS-Spektren in dem in (a) markierten Ausschnitt. (c) SERS-Spektren der Pixel in der untersten Zeile der chemischen Karte in (b). Anregungswellenlänge: 785 nm. . . . | 103 |
| 6.9 | SERS-Spektrum einer gemischten Lösung aus Adenin, Cytosin und Kristallviolett (alle 10^{-6} mol L $^{-1}$) auf immobilisierten Silbernanopartikeln. Anregungswellenlänge: 785 nm. | 105 |
| 6.10 | (a) Exemplarische SERS-Spektren aus der Adeninregion, Cytosinregion und Grenzregion einer nach Abb. 6.5 b hergestellten Probe nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ Kristallviolettlösung. (b) Verteilung des Intensitätsverhältnisses der Ringatemschwingungsbanden von Adenin und Cytosin in den SERS-Spektren in einem Ausschnitt der Grenze zwischen Cytosinregion und gemischter Grenzregion. (c-d) Verteilung des Verstärkungsfaktors (EF) in Ausschnitten der Adenin- und der Cytosinregion. (e) Verteilung des Verstärkungsfaktors in demselben Ausschnitt der Grenze wie in (b). Anregungswellenlänge: 785 nm. | 106 |
| 6.11 | SEHRS-Spektren bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm von (a) Adenin in kolloidaler Silbernanopartikellösung, (b) Adeninlösung auf immobilisierten Silbernanopartikeln und (c) Cytosin in kolloidaler Silbernanopartikellösung. | 109 |
| 6.12 | Absorptionsspektren und Strukturen von Kristallviolett und Malachitgrün. | 110 |
| 6.13 | (a) SEHRS-Spektren (1064 nm) und (b) SERS-Spektren (532 nm) von wässrigen Kristallviolett- und Malachitgrünlösungen sowie einer äquimolaren Mischung beider Analyten auf immobilisierten Silbernanopartikeln. | 111 |

| | | |
|------|---|-----|
| 6.14 | Intensitätsverhältnis der Dimethylamino-Deformationsschwingungsbanden bei 1479 cm^{-1} und 1444 cm^{-1} in den SEHRS-Spektren von Lösungen von Kristallviolett (CV), Malachitgrün (MG) und einer äquimolaren Mischung beider Farbstoffe auf immobilisierten Silbernanopartikeln. . . | 115 |
| 6.15 | Ergebnisse von hierarchischen Clusteranalysen der SEHRS-Spektren von Lösungen von Kristallviolett, Malachitgrün und einer äquimolaren Mischung dieser beiden Farbstoffe. | 116 |
| 6.16 | (a-d) Scores und Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten (PC) aus Hauptkomponentenanalysen der SEHRS-Spektren von Lösungen von Kristallviolett, Malachitgrün und einer äquimolaren Mischung dieser beiden Farbstoffe auf immobilisierten Silbernanopartikeln. (e-h) Entsprechende Ergebnisse der Hauptkomponentenanalysen eines SERS-Datensatzes der gleichen Farbstoffe. | 118 |
| 6.17 | SEM-Aufnahmen der immobilisierten Silbernanopartikel (a, b) ohne Analyten und (c, d) nach sequentielltem Eintauchen in $10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ Kristallviolett- und Malachitgrünlösungen. | 122 |
| 6.18 | Schematische Darstellung der Herstellung und der in den SEHRS- und SERS-Experimenten untersuchten Probenregionen der (a) MG/mix- und (b) CV/mix-Probe. | 125 |
| 6.19 | (a-d) Exemplarische SEHRS- und (e-h) SERS-Spektren aus den jeweils zwei Regionen der MG/mix- bzw. der CV/mix-Probe. Anregungswellenlänge: 1064 nm (a-d), 532 nm (e-h). | 126 |
| 6.20 | (a) Darstellung des Messpunkterasters zur Untersuchung der Grenzregion der MG/mix-Probe. (b) Scores und (c) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten (PC) einer PCA der SEHRS-Spektren aus der Grenzregion in (a) und aus der Malachitgrün- und Mischregion der MG/mix-Probe im Spektralbereich $380\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. (d) Scores und (e) Loadings der ersten beiden PC einer PCA derselben Spektren wie in (b) und (c), aber unter Verwendung des Spektralbereichs $380\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. In (c) und (e) sind die durch die jeweilige PC erklärten prozentualen Anteile an der Gesamtvarianz des Datensatzes angegeben. | 128 |

| | | |
|------|--|-----|
| 6.21 | (a) Darstellung des Messpunkterasters zur Untersuchung der Grenzregion der CV/mix-Probe. (b) Scores und (c) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten (PC) einer PCA der SEHRS-Spektren aus der Grenzregion in (a) und aus der Kristallviolett- und Mischregion der CV/mix-Probe im Spektralbereich $380\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. (d) Scores und (e) Loadings der ersten beiden PC einer PCA derselben Spektren wie in (b) und (c), aber unter Verwendung des Spektralbereichs $380\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. In (c) und (e) sind die durch die jeweilige PC erklärten prozentualen Anteile an der Gesamtvarianz des Datensatzes angegeben. | 130 |
| 6.22 | (a) Scores und (b) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten einer PCA der SERS-Spektren, die parallel zu den in Abb. 6.20 untersuchten SEHRS-Spektren von der MG/mix-Probe gemessen wurden. (c-d) Analoge Daten für die CV/mix-Probe. | 131 |
| 6.23 | (a) Scores und (b) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten (PC) der PCA der SEHRS-Spektren der MG/mix-, CV/mix- und mix-Probe. (c, d) Entsprechende Daten für die SERS-Spektren dieser Proben. . . . | 132 |
| 6.24 | Ergebnis einer hierarchischen Clusteranalyse der SEHRS-Spektren aus den Malachitgrün-, Kristallviolett- und Mischregionen der MG/mix-, CV/mix-, mix- und weiteren, ähnlich hergestellten Proben, sowie der SEHRS-Spektren von Lösungen der beiden Farbstoffe und ihrer Mischung. Verwendeter Spektralbereich: $380\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ | 135 |
| 6.25 | (a) Scores und (b) Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten einer PCA der SEHRS-Spektren aus den unterschiedlichen Regionen der MG/mix-, CV/mix-, mix- und weiterer, ähnlich hergestellter Proben, sowie der SEHRS-Spektren von Lösungen der beiden Farbstoffe und ihrer Mischung, Spektralbereich $380\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. (c, d) Ergebnisse der PCA des gleichen Datensatzes unter Verwendung des Spektralbereichs $380\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ | 136 |
| 6.26 | Hyperspektrale Karten der Grenzregionen (a-d) der MG/mix- und (e-h) der CV/mix-Probe. | 139 |
| 7.1 | Extinktionsspektren von durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellten Silbernanopartikeln ohne Salze und mit $9 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ NaCl bzw. MgSO_4 . Konzentration der Silbernanopartikel: $6 \cdot 10^{-11}\text{ mol L}^{-1}$ | 146 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 7.2 | SEHRS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin bei unterschiedlichen Konzentrationen der Silbernanoaggregate. Anregungswellenlänge: 1064 nm. | 147 |
| 7.3 | SERS-Spektren von <i>p</i> ATP ($9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden, bei verschiedenen Nanopartikelkonzentrationen. Anregungswellenlänge: 405 nm. | 151 |
| 7.4 | SERS-Spektrum von <i>p</i> -Aminothiophenol ($9 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden. Die kolloidale Nanopartikellösung wurde im Verhältnis 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt. Anregungswellenlänge: 405 nm. | 152 |
| 7.5 | SERS-Spektren von <i>p</i> -Aminothiophenol ($9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Hydroxylamin hergestellt wurden. Die kolloidale Nanopartikellösung wurde für das untere Spektrum unverdünnt eingesetzt und für das obere Spektrum im Verhältnis 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt. Anregungswellenlänge: 405 nm. | 152 |
| 7.6 | SERS-Spektren von Adenin ($8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit (a) Citrat bzw. (b) Hydroxylamin hergestellt wurden. Beide Sorten der kolloidalen Nanopartikellösungen wurden im Verhältnis 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt, bevor die Adeninlösung und unterschiedliche Konzentrationen von NaCl zugegeben wurden. Anregungswellenlänge: 405 nm. | 153 |
| 7.7 | Extinktionsspektren von Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden, in kolloidaler Lösung und immobilisiert auf einer Glasoberfläche. | 154 |
| 7.8 | SERS-Spektren von <i>p</i> -Aminothiophenol und Adenin auf immobilisierten Silbernanopartikeln, sowie das Spektrum der immobilisierten Silbernanopartikel ohne Analyten. Anregungswellenlänge: 405 nm. | 155 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|-----|
| 3.1 | Anregungslaser für die Raman- und Hyper-Raman-Experimente. | 43 |
| 3.2 | Bandenpositionen, Bereiche in denen nach dem Maximum der Bande gesucht wurde, und Positionen, an denen jeweils die Intensität des Untergrunds bestimmt wurde, die bei den verschiedenen Analyten für die Bestimmung von Bandenverhältnissen und Verstärkungsfaktoren verwendet wurden. | 48 |
| 4.1 | Bandenpositionen in cm^{-1} und Zuordnungen ^[25,71,103,166–170] für die SERS- und SEHRS-Spektren von <i>p</i> MBA mit Silbernanopartikeln, die durch Reduktion mit Citrat hergestellt wurden. | 62 |
| 5.1 | SERRS-Spektren von (a-c) 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und (d-f) β -Carotin mit Silbernanopartikeln in Gegenwart unterschiedlicher Salze: (a, d) ohne Salz, (b, e) $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NaCl, (c, f) $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ MgSO_4 | 72 |
| 5.2 | Bandenpositionen in cm^{-1} und Zuordnungen ^[36,111,123] für die SEHRS- und SERS-Spektren von 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin und β -Carotin. | 78 |
| 6.1 | Bandenpositionen in cm^{-1} und Zuordnungen ^[200,206] für die SEHRS- und SERS-Spektren von Kristallviolett und Malachitgrün. | 112 |
| 6.2 | Daten zur Abschätzung der Bedeckung der immobilisierten Silbernanopartikel mit Farbstoffmolekülen in den Proben für die bildgebenden SEHRS-Experimente. | 123 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 7.1 | Verhältnisse der Verstärkungsfaktoren bei SERS und SEHRS, ermittelt aus den Raman-Experimenten mit Anregung bei 1064 nm, und Verhältnisse der theoretischen elektromagnetischen Verstärkung bei SERS und SEHRS, ermittelt aus den Extinktionsspektren nach [72] und [88], für <i>p</i> MBA bei pH 7 und für 7'-Apo-7'-(4-mercaptomethylphenyl)- β -carotin. | 144 |
| 7.2 | Mittlere Zeta-Potentiale (in mV) der Silbernanopartikel bei verschiedenen pH-Werten. | 149 |

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der von mir angegebenen Hilfsmittel und Literatur erarbeitet und verfasst habe.

Berlin, 18. Mai 2016

Marina Gühlke

Publikationsliste

Zeitschriftenartikel

M. Gühlke, Z. Heiner, J. Kneipp, „Surface-enhanced hyper-Raman and Raman hyperspectral mapping“, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, DOI: 10.1039/C6CP01625A.

M. Gühlke, Z. Heiner, J. Kneipp, „Surface-Enhanced Raman and Surface-Enhanced Hyper-Raman Scattering of Thiol-Functionalized Carotene“, *Journal of Physical Chemistry C* **2016**, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01895.

M. Espina Palanco, K. B. Mogensen, **M. Gühlke**, Z. Heiner, J. Kneipp, K. Kneipp, „Templated Green Synthesis of Plasmonic Silver Nano Particles in Onion Layers Suitable for Surface Enhanced Raman and Hyper Raman Scattering“, zur Publikation eingereicht.

F. Madzharova, Z. Heiner, **M. Gühlke**, J. Kneipp, „Surface-Enhanced Hyper Raman Spectra of Adenine, Guanine, Cytosine, Thymine, and Uracil“, zur Publikation eingereicht.

M. Gühlke¹, Z. Heiner¹, J. Kneipp, „Combined near-infrared excited SEHRS and SERS spectra for pH sensors using silver nanostructures“, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, 17, 26093-26100.

K. B. Mogensen, **M. Gühlke**, J. Kneipp, S. Kadkhodazadeh, J. B. Wagner, M. Espina Palanco, H. Kneipp, J. Kneipp, „Surface-enhanced Raman scattering on aluminum using near infrared and visible excitation“, *Chemical Communications* **2014**, 50, 3744-3746.

M. Gühlke, S. Selve, J. Kneipp, „Magnetic separation and SERS observation of ana-

¹Gleichberechtigter Beitrag

lyte molecules on bifunctional silver / iron oxide composite nanostructures“, *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, 43, 1204-1207.

Beiträge bei wissenschaftlichen Konferenzen

M. Gühlke, Z. Heiner, J. Kneipp, „Study of combined one-and two-photon excited SERS-nanosensors for bio-applications“, *Workshop FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics*, Berlin, Deutschland **2015** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, Z. Heiner, J. Kneipp, „Examination of different silver nanostructures for near infrared excited surface-enhanced Raman and hyper-Raman scattering“, *Molecular Plasmonics*, Jena, Deutschland **2015** (Abstract & Vortrag).

M. Gühlke, Z. Heiner, J. Kneipp, „Combination of near-infrared excited surface-enhanced Raman and hyper Raman scattering in an optical pH-sensor“, *2nd Optical Nanospectroscopy Conference*, Dublin, Irland **2015** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, Z. Heiner, J. Kneipp, „Hyper-Raman scattering in local fields of different plasmonic nanostructures“, *XXIV. International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS)*, Jena, Deutschland **2014** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, Z. Heiner, J. Kneipp, „Investigation of plasmonic nanostructures for surface enhanced hyper Raman scattering based pH-sensing“, *Surface-Enhanced Spectroscopies*, Chemnitz, Deutschland **2014** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, J. Kneipp, „SERS micromapping as a tool to analyze the two-dimensional distribution of molecules on nanoparticle arrays“, *Workshop FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics*, Berlin, Deutschland **2013** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, J. Kneipp, „Analyzing the distribution of different molecules on immobilized nanoparticles by SERS micromapping“, *Tag der Chemie*, Berlin, Deutschland **2013** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, J. Kneipp, „Analyzing the distribution of different molecules on immobilized nanoparticles by SERS micromapping“, *Molecular Plasmonics*, Jena, Deutschland **2013** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, S. Selve, J. Kneipp, „Bifunctional silver/iron oxide nanostructures for the

combination of magnetic separation and SERS“, *Workshop FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics*, Berlin, Deutschland **2011** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, S. Selve, J. Kneipp, „New Nanoparticulate SERS-Substrates with Magnetic Properties“, *European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM)*, Coimbra, Portugal **2011** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, S. Selve, J. Kneipp, „New Nanoparticulate SERS-Substrates with Magnetic Properties“, *Tag der Chemie*, Berlin, Deutschland **2011** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, S. Selve, J. Kneipp, „New Nanoparticulate SERS-Substrates with Magnetic Properties“, *Molecular Plasmonics*, Jena, Deutschland **2011** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, S. Selve, J. Kneipp, „New Nanoparticulate SERS-Substrates with Magnetic Properties“, *Summer School „Plasmonics, Functionalization and Biosensing“*, Heidelberg, Deutschland **2011** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, S. Selve, J. Kneipp, „New Nanoparticulate SERS-Substrates with Magnetic Properties“, *Berliner Chemie Symposium*, Berlin, Deutschland **2011** (Abstract & Poster).

M. Gühlke, S. Selve, J. Kneipp, „New Nanoparticulate SERS-Substrates with Magnetic Properties“, *ANAKON*, Zürich, Schweiz **2011** (Abstract & Poster).

Berlin, 18. Mai 2016